

Karakterizacija neurona spinalnih ganglija uzgojenih na mikro-igličastim podlogama

Marciuš, Tihana

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:244036>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

TIHANA MARCIUŠ

**KARAKTERIZACIJA NEURONA SPINALNIH GANGLIJA
UZGOJENIH NA MIKRO-IGLIČASTIM PODLOGAMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Damir Sapunar, dr. med.

Split, 2024.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za istraživanje boli Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Istraživanja su provedena uz potporu Hrvatske zaklade za znanost (*projekt: Liječenje neuropatske boli stimulacijom spinalnog ganglija – Neuromod; broj projekta: IP-2013-11-4126; voditelj: prof. dr. sc. Damir Sapunar*).

Voditelj rada: prof. dr. sc. Damir Sapunar, dr. med.

ZAHVALA

Prije svega, iskreno zahvaljujem svom mentoru prof. Damiru Sapunaru na pruženoj prilici, povjerenju i podršci. Veliko hvala za svu pomoć, dragocjene smjernice i znanstvene savjete, preneseno znanje, te razumijevanje kada je bilo potrebno. Hvala što ste mi omogućili da se razvijam kao znanstvenik, ali i kao osoba.

Veliko hvala svim mojim suradnicima i kolegama koji su svojim radom, znanjem i vrijednim sugestijama pridonijeli provedbi ovog istraživanja. Hvala kolegici Katarini Madirazzi koja me bodrila i bila uz mene od samih početaka ovoga puta, hvala na pomoći, prijateljstvu, optimizmu i nesebičnim savjetima. Također, puno hvala mojoj Ivani i Marici za predivno prijateljstvo, druženje i lijepe trenutke provedene zajedno, kako na Zavodu, tako i izvan njega. Hvala što ste vjerovalle u mene i bile mi oslonac u najizazovnijim trenucima. Hvala i mojoj kumi Mireli i svim ostalim prijateljima i dragim ljudima koji su mi bili velika podrška i radost u životu.

Hvala svim profesorima doktorskog studija TRIBE, a posebno voditeljima prof. Damiru Sapunaru i prof. Liviji Puljak, te članovima povjerenstva (prof. Jasna Marinović Ljubković, prof. Srećko Gajović i prof. Maja Valić) na ocjeni i konstruktivnoj raspravi moga rada.

Naposljetku, veliko hvala voljenima, mojim roditeljima, obitelji i suprugu za sve trenutke ohrabrenja, razumijevanja i ljubavi. Bez vaše podrške i inspiracije ovo ne bi bilo moguće. Posebne zahvale idu mojoj mami za svaki trenutak brige, svaki topli obrok, svako čuvanje djece i stalnu podršku u mom životu. Bez tebe ne bi bilo ovog, kao ni bilo kojeg drugog mog uspjeha. Veliko hvala i mom suprugu Robiju, što mi je snaga i oslonac kroz sve izazove. Hvala ti na strpljenju, razumijevanju i neizmjerne ljubavi. Znam da nam put nije bio lak, ali hvala ti na trudu, odricanju i vjeri u nas. I, naravno, hvala mojim prekrasnim djevojčicama Tari, Beli i Moni, vaši osmjesi i zagrljaji moja su najveća motivacija. Zahvaljujući vama, sve što radim dobiva pravi smisao i svrhu.

POPIS OZNAKA I KRATICA

| | |
|-------------|---|
| AHP | naknadna hiperpolarizacija (engl. <i>afterhyperpolarization</i>) |
| AP | akcijski potencijal |
| CGRP | peptid vezan za gen kalcitonina (engl. <i>calcitonin-gene related peptide</i>) |
| CMOS | komplementarni metal-oksidni poluvodič (engl. <i>complementary metal-oxide semiconductor</i>) |
| DIC | diferencijalna interferencijska kontrastna mikroskopija |
| DIV | dani u staničnoj kulturi (engl. <i>days in vitro</i>) |
| DMEM | Dulbeccova modifikacija Eagleovog medija (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>) |
| DR | stražnji rog (engl. <i>dorsal horn</i>) |
| DRG | spinalni ganglij (engl. <i>dorsal root ganglion</i>) |
| ECM | izvanstanični matriks (engl. <i>extracellular matrix</i>) |
| FFT | brza Fourierova transformacija (engl. <i>Fast Fourier Transform</i>) |
| GDNF | neurotropni čimbenik izoliran iz glija stanica (engl. <i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>) |
| HBSS | Hankova balansirana otopina soli (engl. <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>) |
| IASP | Međunarodna organizacija za istraživanje boli (engl. <i>International Association for the Study of Pain</i>) |
| IB4 | izolektin B4 |
| LL | veliki svijetli neuroni (engl. <i>large light DRG neurons</i>) |
| LTM | mehanoreceptori niskog praga podražaja (engl. <i>low-threshold mechanoreceptors</i>) |
| MEA | mikro-elektrodni nizovi / čipovi (engl. <i>micro-electrode arrays</i>) |
| MPS | mikro-igličasti substrati / uzgojne podloge (engl. <i>micro-pillar substrates</i>) |
| NeuN | neuronski jezgrin antigen (engl. <i>neuronal nuclear antigen</i>) |
| NF | neurofilament |
| NGF | čimbenik rasta neurona (engl. <i>nerve growth factor</i>) |
| NT3 | neurotrofin-3 |
| PBS | fosfatni pufer (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>) |
| PSN | primarni osjetni neuron (engl. <i>primary sensory neuron</i>) |
| RIE | reaktivno ionsko jetkanje (engl. <i>reactive ion etching</i>) |
| RMP | membranski potencijal mirovanja (engl. <i>resting membrane potential</i>) |

| | |
|-------------------|--|
| SCS | stimulacija kralježnične moždine (engl. <i>spinal cord stimulation</i>) |
| SD | mali tamni neuroni (engl. <i>small dark DRG neurons</i>) |
| SD štakori | Sprague-Dawley štakori |
| SEM | skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. <i>scanning electron microscopy</i>) |
| SEM | standardna pogreška srednje vrijednosti (engl. <i>standard error of the mean</i>) |
| SNR | odnos signal-šum (engl. <i>signal-to-noise ratio</i>) |
| SŽS | središnji živčani sustav (engl. <i>central nervous system</i>) |
| Trk | receptor tirozin kinaze |
| TRPA | ankirinski receptor iz obitelji kanalnih receptora prolaznog potencijala (engl. <i>transient receptor potential ion channels, of ankyrin subtype</i>) |
| TRPV | vaniloidni receptor iz obitelji kanalnih receptora prolaznog potencijala (engl. <i>transient receptor potential ion channels, of vanilloid subtype</i>) |

SADRŽAJ

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | UVOD..... | 1 |
| 1.1. | Spinalni ganglij i primarni osjetni neuroni..... | 2 |
| 1.1.1. | Klasifikacija neurona spinalnog ganglija..... | 5 |
| 1.1.2. | Elektrofiziološka svojstva neurona spinalnog ganglija..... | 8 |
| 1.2. | Utjecaj trodimenzionalnih (3D) struktura na ponašanje neurona..... | 10 |
| 1.2.1. | Prirodna topografija izvanstaničnog matriksa | 10 |
| 1.2.2. | Topografski modificirane stanične uzgojne podloge | 12 |
| 1.3. | Elektrofiziološke tehnike za snimanje neurona..... | 16 |
| 1.3.1. | Unutarstanične tehnike snimanja | 16 |
| 1.3.2. | Izvanstanične tehnike snimanja | 18 |
| 1.3.3. | Tehnologija mikro-elektrodnih čipova | 19 |
| 2. | CILJEVI I HIPOTEZE | 21 |
| 3. | MATERIJALI I METODE..... | 24 |
| 3.1. | Izrada i dizajn mikro-igličastih podloga..... | 25 |
| 3.2. | Priprema uzgojnih podloga za staničnu kulturu | 26 |
| 3.3. | Pokusne životinje | 27 |
| 3.4. | Kirurški postupak izolacije spinalnih ganglija..... | 27 |
| 3.5. | Kultura neurona spinalnog ganglija | 28 |
| 3.6. | Metodologija za morfološku analizu neurona..... | 29 |
| 3.6.1. | Imunocitokemija i fluorescentna mikroskopija | 29 |
| 3.6.2. | Skenirajuća elektronska mikroskopija | 31 |
| 3.6.3. | Analiza rasta i raspodjele neurona na uzgojnim podlogama | 31 |
| 3.6.4. | Morfometrijska analiza dužine i broja neurita | 32 |
| 3.6.5. | Morfometrijska analiza usmjerenosti neurita pomoću algoritma “Fast Fourier Transformation” (FFT)..... | 33 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.7. | Metodologija za elektrofiziološku analizu neurona | 39 |
| 3.7.1. | Patch-clamp sustav..... | 39 |
| 3.7.2. | Elektrofiziologija | 40 |
| 3.7.3. | Analiza elektrofizioloških podataka | 41 |
| 3.8. | Statistički postupci | 41 |
| 4. | REZULTATI | 42 |
| 4.1. | Rezultati morfološke analize neurona | 43 |
| 4.1.1. | Rast i raspodjela neurona spinalnog ganglija na mikro-igličastim podlogama . | 43 |
| 4.1.2. | Dužina i broj neurita na mikro-igličastim podlogama | 47 |
| 4.1.3. | Usmjerenost neurita na mikro-igličastim uzgojnim podlogama..... | 50 |
| 4.2. | Rezultati elektrofiziološke analize neurona | 53 |
| 4.2.1. | Princip prilagođenog patch-clamp sustava | 53 |
| 4.2.2. | Elektrofiziološka svojstva neurona spinalnog ganglija na MPS podlogama | 56 |
| 5. | RASPRAVA..... | 61 |
| 5.1. | Utjecaj MPS podloga na raspodjelu i morfologiju neurona spinalnog ganglija | 62 |
| 5.2. | Utjecaj MPS podloga na elektrofiziološka svojstva neurona spinalnog ganglija | 65 |
| 6. | ZAKLJUČAK..... | 68 |
| 7. | SAŽETAK..... | 70 |
| 8. | SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU (SUMMARY)..... | 72 |
| 9. | POPIS LITERATURE | 74 |
| 10. | ŽIVOTOPIS | 91 |

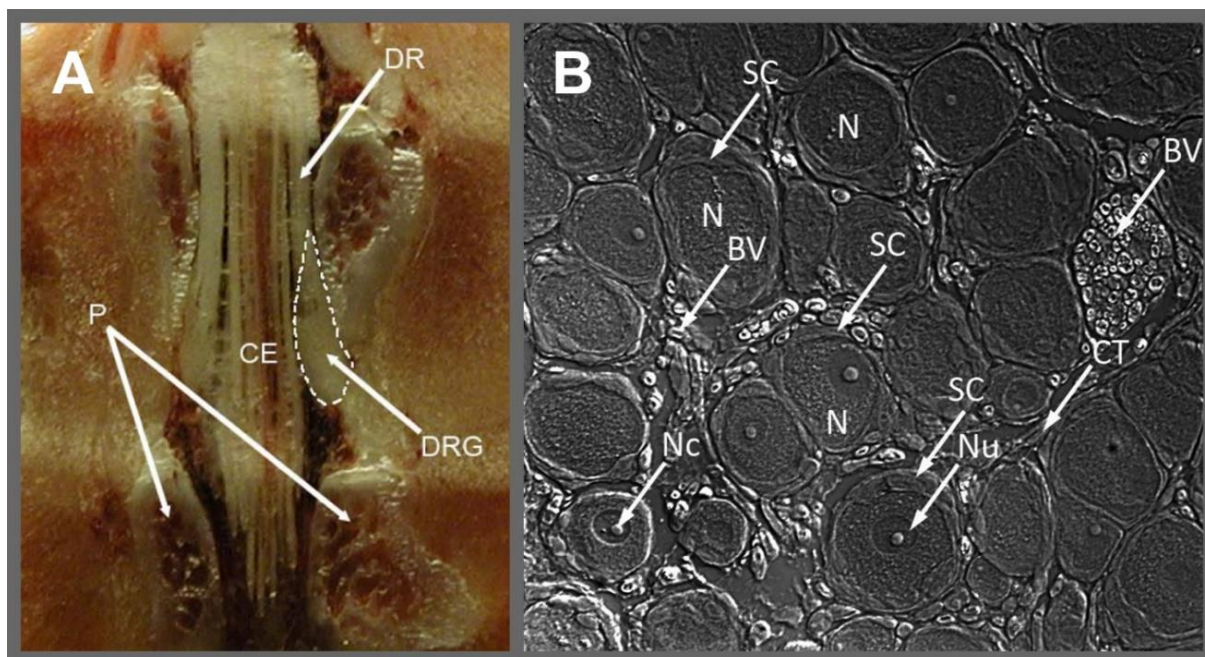
1. UVOD

1.1. Spinalni ganglij i primarni osjetni neuroni

Spinalni ganglij (engl. *dorsal root ganglion*, DRG) bilateralna je struktura na svakoj razini kralješka građena od tijela primarnih osjetnih neurona (engl. *primary sensory neurons*, PSN). Neuroni spinalnog ganglija odgovorni su za prijenos osjetnih informacija od receptivnih polja na periferiji, poput kože, mišića i unutarnjih organa do središnjeg živčanog sustava (SŽS) (1). Osjetni modaliteti kojima posreduju neuroni spinalnog ganglija uključuju dodir (prepoznavanje veličine, oblika i teksture predmeta te njihovog pomicanja po koži), propriocepciju (osjećaj statičnog položaja i pokreta udova i tijela), nocicepciju (signaliziranje oštećenja tkiva ili kemijske iritacije, obično percipirane kao bol ili svrbež) i temperaturni osjet (toplina i hladnoća) (2).

Spinalni ganglij smješten je u intervertebralnom otvoru između dorzalnog korijena i spinalnog živca (Slika 1A). Svaki ganglij sadrži oko 15 000 tijela neurona, zaštićenih ovojnicom satelitskih stanica koje pružaju metaboličku i funkcionalnu potporu (Slika 1B). Ganglij također obiluje malim krvnim žilama koje formiraju gustu mrežu kapilara, osiguravajući zadovoljenje potreba osjetnih neurona za energijom i kisikom. Zbog iznimne dužine njihovih aksona, koji mogu doseći do 1,5 metara, i male veličine tijela neurona (promjera 20-50 μm), kontinuirana sinteza proteina i organela, te njihov transport do udaljenih aksona, predstavljaju metabolički zahtjevan, ali vitalan proces za njihovo pravilno funkcioniranje (1).

Spinalni ganglij ne posjeduje učinkovitu neurovaskularnu barijeru, što omogućuje lako prodiranje spojeva velike molekulske mase iz krvotoka, uključujući proteine, lijekove pa čak i makrofage, u prostor koji okružuje neurone (3). Spinalnom gangliju nedostaje i čvrsta vezivna ovojnica. Propusnosti vezivne ovojnice doprinosi i vrlo velika gustoća kapilara u tkivu ganglija (4). Položaj izvan krvno-moždane barijere i propusna vezivna ovojnica spinalni ganglij čine izvrsnim mjestom za apliciranje sustavnih i lokalnih terapijskih lijekova (3). Zbog guste kapilarne mreže i bogate opskrbe krvlju spinalni ganglij je otporan na toksično djelovanje lijekova jer visoka razina perfuzije sprječava dugotrajno zadržavanje anestetika unutar ganglija i samim time dosezanje toksičnih koncentracija (5).



Slika 1. Položaj i histološka građa spinalnog ganglija. A) Položaj petog lumbalnog spinalnog ganglija štakora, smještenog između dorzalnog korijena i spinalnog živca (nije prikazano), te njegov odnos s okolnim koštanim strukturama i kralježničnom moždinom. B) Smrznuti presjek spinalnog ganglija koji prikazuje tijela primarnih osjetnih neurona okružena satelitskim glija stanicama. **Kratice:** DRG – spinalni ganglij; DR – dorzalni korijen; CE – cauda equina; P – pedikuli; SC – satelitske glija stanice; N – neuroni; Nc – jezgra; Nu – nukleolus; BV – krvne žile; CT – vezivno tkivo. Preuzeto i prilagođeno prema (6).

Spinalni ganglij predstavlja ključnu strukturu u procesu prijenosa i modulacije osjetilnih informacija, uključujući percepciju boli. Osim što ima centralnu ulogu u nociceptivnoj boli, odnosno normalnom fiziološkom odgovoru na štetne ili potencijalno štetne podražaje putem aktivacije nociceptora ("receptora za bol"), spinalni ganglij također igra važnu ulogu u razvoju i održavanju neuropatske boli (7). Za razliku od nociceptivne boli, neuropatska bol predstavlja kronično stanje bez zaštitne funkcije, nastalo izravnim oštećenjem živčanog sustava, neovisno o vanjskim podražajima. Naime, nakon ozljede perifernih aferentnih vlakana ili upale, spinalni ganglij prolazi kroz kompleksne promjene u fenotipu i funkciji, uključujući genetske, elektrofiziološke, te imunološke promjene, što rezultira povećanom podražljivosti i spontanom ektopičnom aktivnošću neurona, uzrokujući kroničnu neuropatsku bol (8-13).

Neuroni spinalnog ganglija karakterizirani su pseudounipolarnom morfologijom, što znači da njihov akson na mjestu tzv. T-spoja (engl. *T-junction*) formira dvije grane: jedna vodi do periferije, a druga do dorzalnog roga kralježnične moždine. Na T-spoju dolazi do prirodnog filtriranja, što ograničava širenje akcijskih potencijala prema SŽS-u (14-16). Međutim, ozljeda perifernog živca može izazvati promjene u broju i distribuciji ionskih kanala, utječući na dostupnost iona u neuronima, što posljedično oslabljuje filtriranje akcijskih potencijala na T-spoju, pojačavajući time širenje bolnih signala i osjet boli (17).

Zbog anatomske dostupnosti i ključne uloge u modulaciji i prijenosu osjetnih signala u SŽS, spinalni ganglij postao je cilj raznih terapijskih metoda za liječenje boli. Ove metode uključuju primjenu protuupalnih steroida, kiruršku ablaciju (ganglionektomiju), radiofrekvencijsku modulaciju, te terapiju električnom energijom (neurostimulaciju/neuromodulaciju) (18, 19). Električna stimulacija spinalnog ganglija posebno je obećavajuća metoda koja se sve češće koristi u kliničkoj praksi, pokazujući pozitivne rezultate u ublažavanju nekih vrsta kronične boli, kako u studijama na životinjama (20) tako i u kliničkim ispitivanjima (21). Usprkos tome, kliničke studije koje istražuju učinke stimulacije spinalnog ganglija na ublažavanje boli imaju određena ograničenja, poput malog broja sudionika i visoko selektirane populacije pacijenata, što nalaže oprez u tumačenju trenutno dostupnih dokaza (21).

Iako su mehanizmi djelovanja električne stimulacije spinalnog ganglija još uvijek nedovoljno razjašnjeni, postoji nekoliko teorija. Teorija nadziranog ulaza (engl. *gate control theory*), koju su Melzack i Wall predložili 1965. godine, sugerira da aktivacija A β živčanih vlakana velikog promjera, koja prenose neškodljive mehaničke podražaje, blokira prienos nociceptivnih signala manjim C vlaknima, čime se smanjuje osjet boli (22). Međutim, ova teorija možda nije dovoljna za objašnjenje mehanizma stimulacije spinalnog ganglija, koja djeluje tako što normalizira periferni nociceptivni input prije nego što stigne do kralježnične moždine (23). Predloženo je da električna stimulacija smanjuje sposobnost stvaranja akcijskih potencijala u osjetnim neuronima, smanjujući njihovu ektopičnu aktivnost i time osiguravajući analgeziju. Druga mogućnost je da stimulacija pojačava filtracijsko svojstvo T-spoja, sprječavajući širenje akcijskih potencijala kroz T-spoj i time smanjujući osjet boli (24, 25).

1.1.1. Klasifikacija neurona spinalnog ganglija

Neuroni spinalnog ganglija čine izrazito heterogenu skupinu zbog svoje različitosti u morfološkim, elektrofiziološkim, funkcionalnim i neurokemijskim karakteristikama. Raznolikost među osjetilnim neuronima spinalnog ganglija ogleda se u nizu značajki, poput osjetljivosti na podražaje, veličine staničnih tijela, debljine vlakana i brzine provođenja, kao i ekspresije proteina i područja koje inerviraju, što je dovelo do primjene različitih kriterija klasifikacije za definiranje njihovih podskupina.

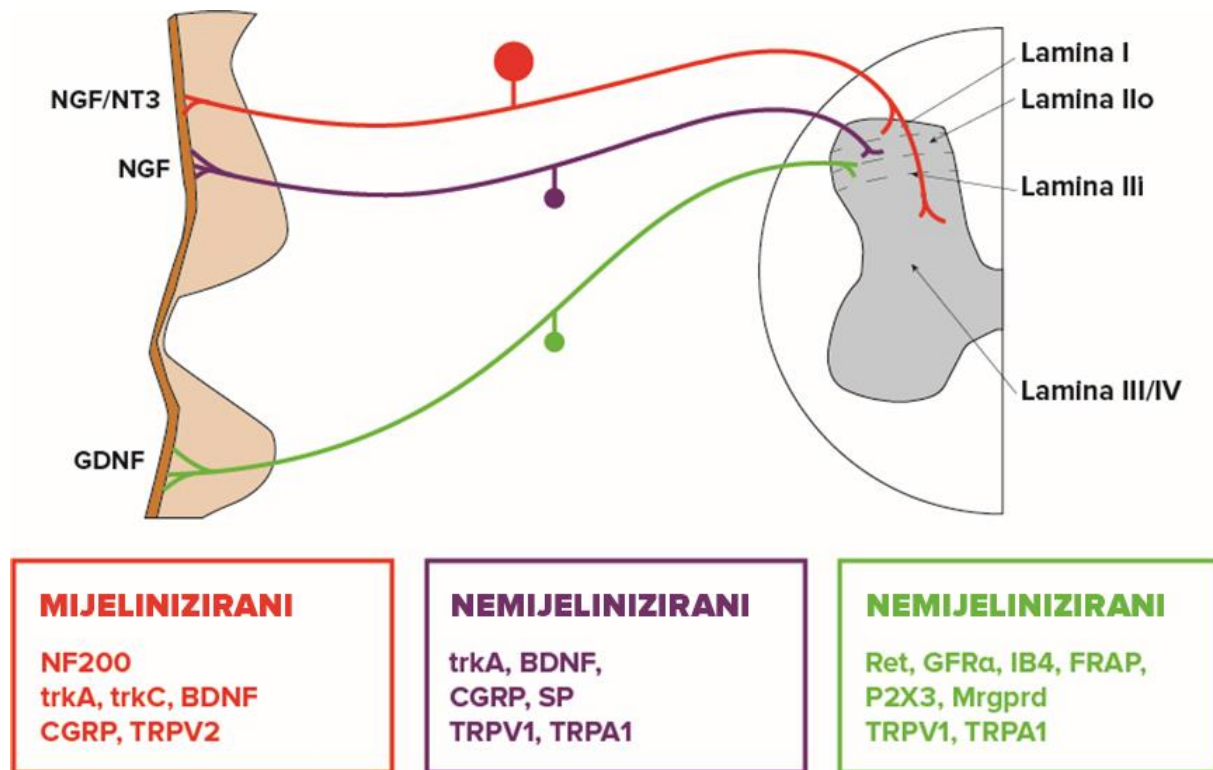
Jedan od prvih kriterija za razlikovanje neurona spinalnog ganglija temelji se na veličini njihovih tijela, što ih dijeli na dvije glavne histološke skupine: neurone s velikim, svijetlim tijelima, obilježenima neravnomjernim obojenjem zbog nakupina Nisslove tvari razdvojenih blago obojenim regijama citoplazme bogate mikrotubulima i obiljem neurofilamenata (LL ili A-tip neuroni), te neurone s malim, tamnim tijelima, siromašnima neurofilamentima, s ravnomjerno, tamnije obojenom Nisslovom tvari (SD ili B-tip neuroni) (26). Stoga se za razlikovanje ovih morfološki definiranih skupina neurona često koristi imunološko bojenje za neurofilamente, posebice za fosforilirani oblik neurofilamentne podjedinice od 200-kDa (NF200) (27, 28).

Neuroni spinalnog ganglija mogu se također klasificirati temeljem elektrofizioloških mjerenja brzine provođenja akcijskih potencijala duž njihovih aksonskih vlakana u tri glavne kategorije: neuroni s mijeliniziranim, brzo provodećim A α / β -vlaknima; neuroni sa slabo mijeliniziranim, sporije provodećim A δ -vlaknima; te neuroni s nemijeliniziranim, najsporije provodećim C-vlaknima (29). Kombinirajući unutarstanična snimanja s imunocitokemijom, pokušala se uspostaviti veza između ovih glavnih vrsta vlakana (A-i C-tip) i dvije glavne podskupine neurona klasificirane prema veličini njihovih tijela (LL i SD neuroni), kao i s funkcijom osjetnih neurona. Otkriveno je da, općenito, veličina tijela neurona korelira s brzinom provođenja i tipom vlakna, tako da veliki svijetli neuroni (LL) često razvijaju mijelinizirana A α / β -vlakna te postaju proprioceptori i mehanoreceptori, dok mala tamna populacija neurona (SD) obično ima A δ - i C-vlakna s raznovrsnijim funkcionalnim svojstvima, uključujući nociceptore i termoreceptore (30, 31). Na temelju visokog sadržaja neurofilamenata u LL neuronima i njihovih mijeliniziranih A-vlakna, neurokemijski marker NF200 može se stoga koristiti za razlikovanje neurona s A- i C-vlaknima (31).

Uzimajući u obzir sposobnost organizma da detektira štetne podražaje koji mogu oštetiti ili potencijalno oštetiti tkivo, neuroni spinalnog ganglija mogu se kategorizirati kao ne-nociceptivni i nociceptivni (32, 33). Ne-nociceptivni neuroni detektiraju blage i neškodljive mehaničke i toplinske podražaje, obično proizvodeći osjete različite od boli, a najveću skupinu čine kožni mehanoreceptori niskog praga s velikim ili srednjim tijelima neurona, visokim razinama neurofilamena (NF200), A α / β -vlaknima te specijaliziranim perifernim završecima u koži. Nociceptivni neuroni, s druge strane, aktiviraju se samo kada je podražaj dovoljno intenzivan da izazove potencijalnu štetu tkivu, što rezultira osjetom boli (34). Ti neuroni obično imaju mala ili srednja tijela i slobodne živčane završetke, te većinom provode impulse kroz C- i A δ -vlakna. Neuroni s A δ -vlaknima prenose brzu, lokaliziranu bol, dok neuroni s C-vlaknima prenose sporu, difuznu bol (35). Postoji i određeni broj nociceptivnih neurona s A α / β -vlaknima (36, 37). Nociceptivni neuroni s A-vlaknima mogu se dodatno podijeliti u dva tipa: tip I, spadaju u kategoriju između A δ - i A α / β -vlakana, s nižim pragom za mehaničke, te višim pragom za toplinske podražaje, posredujući u „prvom“ odgovoru na intenzivne mehaničke podražaje; te tip II koji su isključivo A δ -vlakna, te imaju značajno niži prag za toplinu, ali visok prag za mehaničke podražaje, što ukazuje da posreduju u „prvom“ odgovoru na štetne toplinske podražaje (38). Nociceptivni neuroni s C-vlaknima većinom su polimodalni, odnosno reagiraju na štetne mehaničke, toplinske i kemijske podražaje, dok su ostali, tzv. tihi nociceptori, osjetljivi na štetnu toplinu i kemijske podražaje, ali su nisu osjetljivi na mehaničke podražaje te razvijaju mehaničku osjetljivost samo u uvjetima upale ili ozljede (39).

Nadalje, nociceptivni neuroni spinalnog ganglija mogu se kategorizirati na temelju neurokemijskih karakteristika u dvije osnovne kategorije: peptidergičke i nepeptidergičke neurone (40). Pojam "peptidergički" odnosi se na neurone koji oslobađaju neuropeptide poput peptida vezanog za gen kalcitonina (engl. *calcitonin-gene related peptide*, CGRP) i tvari P. Najjača ekspresija CGRP-a uočena je u malim neuronima s nemijeliniziranim C-vlaknima, koji djeluju kao polimodalni nociceptori (Slika 2, ljubičasto). Jasna prisutnost CGRP-a primijećena je i u neuronima srednje veličine koji sadrže neurofilamente (NF200) i mijelinizirana A δ -vlakna, tipično za nociceptore (Slika 2, crveno). Iako je pronađeno i nekoliko slabo CGRP-pozitivnih mehanoreceptivnih neurona velikog promjera, intenzivna ekspresija pokazala se samo u nociceptorima, što CGRP čini ključnim molekularnim markerom peptidergičkih nociceptivnih neurona (41-43). S druge strane, nepeptidergički neuroni spinalnog ganglija ili ne proizvode neuropeptide ili ih imaju u vrlo niskim koncentracijama. Za identifikaciju ove skupine neurona često se koristi bojenje izolektinom B4 (IB4), dobivenim iz biljke *Griffonia*

simplicifolia, koji se veže na neurone malog promjera s nemijeliniziranim C-vlaknima, preko α -D-galaktoznih ugljikohidrata na njihovim membranama (44, 45). Istraživanja pokazuju da su IB4-pozitivni neuroni isključivo polimodalni nociceptori (46).



Slika 2. Shematski prikaz triju glavnih populacija nociceptivnih neurona spinalnog ganglija: Peptidergički (**crveno označeni**) neuroni srednje veličine, obogaćeni neurofilamentom (NF200), s mijeliniziranim A δ -vlaknima koja uglavnom inerviraju lamine I i III/IV. Ovi nociceptori izražavaju TRPV2 te neurotrofne receptore TrkA i TrkC, koji vežu NGF i NT3. Peptidergički (**ljubičasto označeni**) neuroni malog promjera s nemijeliniziranim C-vlaknima koja inerviraju pretežno lamine I i II. Ovi polimodalni nociceptori izražavaju TRPV1 i TRPA1, te reagiraju na NGF. Nepeptidergički (**zeleno označeni**) neuroni malog promjera s nemijeliniziranim C-vlaknima koja inerviraju središnju laminu II. Ovi polimodalni nociceptori također izražavaju TRPV1 i TRPA1, kao i neurotrofni receptor c-Ret, koji veže GDNF. **Kratice:** NGF – čimbenik rasta neurona; NT3 – neurotrofin-3; Trk – receptor tirozin kinaze; TRPV – vaniloidni receptor iz obitelji kanalnih receptora prolaznog potencijala; TRPA – ankirinski receptor iz obitelji kanalnih receptora prolaznog potencijala; GDNF – neurotrofni čimbenik izoliran iz glija stanica. Preuzeto i prilagođeno prema (47).

1.1.2. Elektrofiziološka svojstva neurona spinalnog ganglija

Primarna uloga osjetnih neurona je prijenos osjetilnih informacija, odnosno slijeda akcijskih potencijala (AP), od njihovih perifernih receptivnih polja do središnjeg živčanog sustava. Stvaranje AP-a na perifernom kraju primarnog osjetnog neurona je elektrokemijski odgovor na mehaničke, toplinske ili kemijske podražaje koji aktiviraju ionske kanale na membrani neurona uzrokujući depolarizaciju membrane i stvaranje lokalnog potencijala. Ako je lokalni potencijal dovoljno jak i doseže vrijednost praga podražaja (engl. *threshold*), aktivira naponom-regulirane ionske kanale, pokrećući akcijski potencijal (48). Naponom-regulirani natrijevi (Na^+) i kalijeve (K^+) kanali odgovorni su za stvaranje akcijskih potencijala, dok naponom-regulirani kalcijevi (Ca^{2+}) kanali reguliraju sinaptički prijenos i oslobađanje neurotransmitera (34). Ukratko, akcijski potencijal inicira se unutarnjom Na^+ strujom, koja se brzo sama inaktivira, ali ne prije nego što rezultirajuća depolarizacija pokrene unutrašnju Ca^{2+} struju, kao i vanjsku K^+ struju koja repolarizira membranu, završavajući ciklus AP-a. Od perifernih receptora, akcijski potencijal se provodi duž aksona do dorzalnog roga kralježnične moždine, i dalje do talamusa i mozga, gdje nastaju osjeti (1).

Istraživanje električnih svojstava neurona ključno je za razumijevanje njihovih fizioloških funkcija i promjena u patološkim stanjima. Naponom-regulirani Na^+ kanali posreduju u inicijaciji i fazi rasta ili depolarizacije akcijskog potencijala. Stoga, promjene u njihovoj funkciji ili ekspresiji mogu značajno utjecati na električnu podražljivost neurona spinalnog ganglija i signalizaciju boli (49). Na primjer, ozljeda živca može izazvati promjene u ekspresiji i aktivacijskim svojstvima natrijevih kanala, dovodeći do promjena u membranskoj strukturi neurona i povećane podražljivosti povezane s neuropatskom boli (50). Neuropatska bol tipično se manifestira spontanom ili patološkom aktivnošću koja je posljedica sniženog praga za inicijaciju akcijskog potencijala, uzrokujući preosjetljivost na bol (hiperalgezija) i bol od neškodljivih podražaja (alodinja) (18). Osim povećane ekspresije Na^+ kanala, nakon ozljede živca dolazi i do smanjenja u ekspresiji naponom-reguliranih K^+ kanala (51). Budući da je otvaranje ovih kanala odgovorno za padajuću ili repolarizirajuću fazu akcijskog potencijala, smanjenje njihove aktivnosti nakon ozljede može dovesti do povećane podražljivosti neurona i razvoja kronične boli (52). Naponom-regulirani Ca^{2+} kanali posebno su važni u modulaciji boli jer Ca^{2+} ioni ne samo da nose depolarizirajući naboj, već djeluju i kao sekundarni glasnici. Ozljede živca, poput aksotomije, mogu smanjiti unutarnji dotok Ca^{2+} u neurone (53), što

rezultira povećanjem broja akcijskih potencijala, povećanom podražljivošću neurona (54) te nastankom neuropatske boli (55).

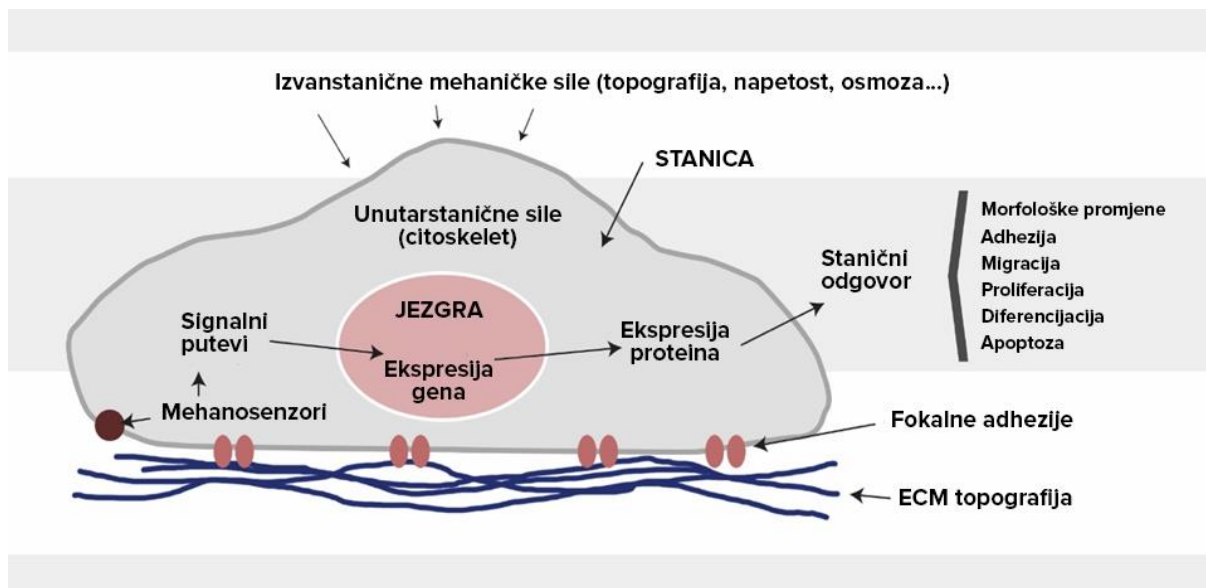
Sva tri glavna tipa ionskih kanala (Na^+ , Ca^{2+} i K^+) igraju ključnu ulogu u oblikovanju akcijskog potencijala i naknadne hiperpolarizacije (AHP). Zbog svoje uloge u rastućoj fazi AP-a, Na^+ kanali imaju veliki utjecaj na vrijeme porasta AP-a (engl. *AP rise time*), a time i na trajanje AP-a (engl. *AP duration*) i brzinu provođenja, dok K^+ kanali doprinose trajanju AHP-a zbog svoje uključenosti u padajuću fazu AP-a. Istraživanja pokazuju da nociceptivni neuroni, u usporedbi s nenociceptivnima, često imaju „šire vrhove“ AP-a, što znači duže trajanje AP-a i AHP-a, te veći prebačaj potencijala (engl. *AP overshoot*). Dodatno, nociceptivni neuroni mogu imati karakterističnu infleksiju ili “grbu“ u padajućoj fazi AP-a (36, 56). U patološkim stanjima, posebice nakon ozljede, ti su parametri od posebne važnosti za razumijevanje mehanizama povećane osjetljivosti na bol. U neuronima spinalnog ganglija zahvaćenima aksotomijom zabilježeno je povećanje trajanja AP-a te smanjenje amplitude i trajanja AHP-a (11). Te promjene AP-a povezane su s manjim priljevom Ca^{2+} iona, što dovodi do smanjene K^+ struje odgovorne za stvaranje AHP-a. To rezultira smanjenjem veličine AHP-a i dovodi do povećanog nociceptivnog prometa u dorzalnom rogu kraljeznične moždine, uzrokujući povećanu podražljivost neurona i neuropatsku bol. Smanjenje Ca^{2+} struje dodatno produljuje trajanje AP-a, što može rezultirati većim oslobađanjem ekscitatornih neurotransmitera na prvoj sinapsi dorzalnog roga, pojačavajući signalizaciju boli (55).

1.2. Utjecaj trodimenzionalnih (3D) struktura na ponašanje neurona

Na ponašanje kultiviranih staničnih modela, posebice neurona, značajno utječu kemijska i fizička svojstva njihova mikro-okruženja (57, 58). Modulacijom staničnog okoliša *in vitro* može se precizno upravljati ponašanjem stanica, što otvara put razvoju inovativnih biomedicinskih tretmana i terapija. Konvencionalne monoslojne podloge za staničnu kulturu, poput staklenih ili plastičnih uzgojnih podloga, pružaju dragocjene uvide u ponašanje stanica, ali njihova ograničenja proizlaze iz nedostatka strukturalne potpore karakteristične za uvjete *in vivo*, što može imati značajan utjecaj na performanse stanica i rezultate bioloških ispitivanja (59, 60). Nasuprot tome, trodimenzionalne (3D) uzgojne podloge oponašaju strukturalnu arhitekturu bioloških tkiva, omogućavajući time fiziološki relevantnije okruženje za rast, morfologiju i funkcionalni razvoj stanica. Ove trodimenzionalne podloge, obogaćene mikro- i nanostrukturama raznih oblika, poput brazdi (engl. *grooves*), stupića ili iglica (engl. *pillars*), sve su češći izbor u staničnoj biologiji za kreiranje potpornih struktura ili nosača (engl. *scaffolds*), nalazeći primjenu u raznim područjima kao što su neurobiologija, kardiologija i bioinženjerstvo (61).

1.2.1. Prirodna topografija izvanstaničnog matriksa

Razumijevanje načina na koji stanice percipiraju vanjske utjecaje iz svog prirodnog okoliša te reagiraju na njih mijenjajući svoja biološka, kemijska i fizička svojstva, jedna je od ključnih strategija u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini. Osim biokemijskih signala poput faktora rasta i hormona, sve više se prepoznaje važnost fizičkih signala poput topografije i čvrstoće, kao temeljnih čimbenika u regulaciji sudbine i funkcije stanica (57, 58, 62, 63). *In vivo*, ovi fizički signali se prezentiraju stanicama kroz različite topografske strukture izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) na mikro- i nano-razini, poput bazalnih membrana raznih tkiva (62, 64, 65). Stanice stupaju u interakciju s ovim topografskim strukturama ECM-a, često kroz fenomen „kontaktnog vođenja“ (engl. *contact guidance*), pomoću kojeg ECM daje smjernice i regulira migraciju stanica (66-68). Stoga, trodimenzionalna struktura ECM-a djeluje kao fizički nosač, omogućavajući stanicama da „osjete“ topografiju svog okruženja i reagiraju na nju, bilo fizičkim odgovorom, poput promjene oblika stanice ili citoskeleta, ili kroz biokemijske odgovore, aktiviranjem signalnih kaskada (Slika 3) (64, 69, 70).



Slika 3. Shematski prikaz pojedinačne stanice vezane za kompleksan izvanstanični matriks pomoću fokalnih adhezija. Ovaj proces ilustrira integraciju i transformaciju različitih fizičkih signala iz okoline stanice, poput topografije i čvrstoće, u signalne odgovore unutar stanice, što rezultira promjenama u njezinoj funkciji. Te promjene uključuju prilagodbe u morfološkoj (poput usklađivanja oblika stanice ili organizacije citoskeleta), adheziji, migraciji, proliferaciji, diferencijaciji i procesima stanične smrti. Modificirano prema (71).

Topografija ima značajan utjecaj na mnoge tipove stanica, uključujući neurone i glija stanice. Razvojna istraživanja otkrila su da prirodne topografske karakteristike poput usmjerenih vlakana izvanstaničnog matriksa ili rasporeda drugih stanica služe kao putokazi za migraciju neurona prilikom razvoja živčanog sustava. Primjerice, tijekom razvoja cerebralnog korteksa, kortikalni neuroni migriraju duž radijalnih glija stanica (72), dok neuroblasti tijekom razvoja malog mozga prate prethodno formirana aksonska vlakna (73). Slično tome, neuroni u produljenoj moždini se kreću paralelno s usmjerenim vlaknima izvanstaničnog matriksa (74).

Ključni mehanizam kojim topografske strukture *in vivo* reguliraju migraciju neurona je djelovanje rastućeg konusa (engl. *growth cone*), vrlo pokretljivog prednjeg kraja aksona, koji detektira biokemijske i fizičke signale iz okoline te ih koristi za navigaciju duž određenih putanja, omogućujući time produljenje aksona (75). Na taj se način potiče usmjereni rast (engl. *alignment*) neurona, koji ovisi o fizičkom obliku podloge na kojoj neuroni rastu. Osim u razvoju, ovaj mehanizam ima važnu ulogu i u procesima popravka, gdje se, na primjer,

Schwannove stanice organiziraju u uzdužne kolone služeći kao vodiči za rast regenerirajućih perifernih živaca (76).

1.2.2. Topografski modificirane stanične uzgojne podloge

Razvoj mikro- i nanotehnologija, uključujući fotolitografiju, litografiju elektronskim snopom i meku litografiju, omogućio je stvaranje trodimenzionalnih uzgojnih podloga za *in vitro* kultivaciju stanica sa strogo definiranim topografskim strukturama (77). Takve strukture, poput brazda (engl. *grooves*) ili iglica/stupića (engl. *pillars*), sposobne su pokrenuti stanični odgovor i snažno utjecati na staničnu morfologiju, usmjereni rast neurita, adheziju, migraciju, proliferaciju, genetske promjene i diferencijaciju (78-80). To je zbog toga što umjetno proizvedena topografija 3D podloga oponaša stanično prirodno okruženje, replicirajući izvornu topografiju izvanstaničnog matriksa, čime izravno utječe na funkciju stanica (78). Kontroliranjem topografskih značajki uzgojnih podloga omogućava se precizna regulacija ponašanja stanica (81), što ih čini iznimno korisnima u raznim biomedicinskim primjenama kao što su tkivno inženjerstvo, proizvodnja implantata i razvoj mikročipova (81). Primjena topografski dizajniranih 3D platformi u rekonstrukciji cjelovitih tkiva, uključujući zamjene za rožnicu (82) i vaskularne transplantate (83), ističe njihovu vrijednost i potencijal u suvremenoj biomedicini.

Veličina i raspored topografskih elemenata imaju presudnu ulogu u modulaciji staničnih odgovora (80). Istraživanja su pokazala kako postoji optimalna veličina topografskih elemenata koja potiče najintenzivniji odgovor stanica, varirajući od nano- do mikrometerske skale, ovisno o tipu stanice, materijalu uzgojne podloge te obliku topografskih struktura. Dok nanostrukturna topografija primarno utječe na unutarstanična događanja kao što je organizacija molekula potrebnih za staničnu adheziju, mikrostrukturna topografija ima veći utjecaj na stanične i međustanične aspekte, poput morfologije i migracije stanica (70).

Za razliku od drugih vrsta stanica, neuroni posjeduju složenu mrežu aksona i dendrita, zajednički poznatih kao neuriti, koji su odgovorni za prijenos vitalnih elektrokemijskih signala i informacija po cijelom tijelu. Kontrola usmjerenosti neurita *in vitro* stoga je ključna za nekoliko područja, uključujući: 1) temeljna istraživanja interakcije neurona s topografskim značajkama njihove okoline, koristeći 3D uzgojne podloge, 2) razvoj novih mikro-elektrodnih

čipova namijenjenih istraživanju dinamike i funkcionalnosti neuronskih mreža, i 3) klinička istraživanja u području implantata i nosača za neuronske stanice (engl. *scaffolds*), odnosno razvoj naprednih neuronskih uređaja s integriranim topografskim strukturama za primjene u tkivnom inženjerstvu. U nastojanju da se postigne takva kontrola, intenzivno se istražuju različite topografije, bilo anizotropne (s paralelnim, kontinuiranim strukturama) ili izotropne (s okomito orijentiranim elementima), omogućavajući različite načine usmjeravanja rasta neurita (61, 79).

Uzgojne podloge s anizotropnom topografijom (Slika 4A), koje se sastoje od elemenata poput kontinuiranih izmjeničnih udubljenja i izbočenja (engl. *grooves and ridges*), pružaju topografske smjernice za rast uglavnom duž jedne osi. Na takvim podlogama neuriti pokazuju usmjereni rast (engl. *alignment*) paralelno s kontinuiranim linijama topografije, proces poznat kao paralelno kontaktno vođenje (84-91). Postoje i rijetki slučajevi kada neuriti rastu okomito na ove linije, što se naziva okomito kontaktno vođenje (92-94). Stupanj usmjerenog rasta neurita na ovim uzgojnim podlogama ovisi o veličini topografskih struktura, uključujući njihovu dubinu, širinu i međusobni razmak, pri čemu dublje, uže i manje razmaknute linije potiču veći stupanj usmjerenog rasta.

Uzgojne podloge s izotropnom topografijom (Slika 4B) uključuju elemente u obliku okomitih stupića ili iglica (engl. *pillars*) (95-100), stožastih stupova (engl. *conical posts*) (101, 102) i nano-niti (engl. *nanowires*) (103, 104). Ove strukture tipično pružaju topografske orijentire duž više osi, kroz jednolike i simetrične fizičke karakteristike, kao što je razmak između stupića. Strukture se također mogu organizirati na način da se fizičke značajke mijenjaju duž određenog smjera (npr. asimetričan razmak između stupića) (Slika 4C). Za razliku od kontinuiranih paralelnih linija, koje neuritima obično omogućavaju kretanje u samo dva smjera, okomiti stupići nude neuritima više opcija za smjer kretanja, djelujući kao točke pričvršćivanja ili vodiči koji usmjeravaju rast neurita (95). Na tim uzgojnim podlogama neuriti formiraju kontakte i prate ove stupiće; ako se pojavi novi stupić u blizini, neuriti se protežu prema njemu, uspostavljajući kontakt, što rezultira visokim stupnjem usmjerenosti rastućih neurita, čak i na izotropnim podlogama (63, 95, 97). Pokazalo se da s povećanjem veličine i razmaka između stupića usmjerenost neurita opada, čineći je sličnoj onoj na glatkim podlogama bez topografskih struktura (95-97, 99, 101). Osim usmjerenosti rasta neurita, koriste se i drugi kvantitativni testovi za procjenu odgovora neurona na topografiju, uključujući prosječnu dužinu neurita po stanici ili dužinu najduljeg neurita (105, 106), ukupnu brzinu rasta neurita

(107), stupanj grananja neurita (108), prosječan broj neurita po stanici (106, 108) i broj stanica koje formiraju neurite (109).



Slika 4. Shematski prikaz uobičajenih topografija koje se koriste kao podloge za kultivaciju stanica: A) Anizotropne topografije, koje su orijentirane u određenom smjeru i pružaju smjernice za rast duž jedne osi; B) Izotropne topografije, koje imaju identične karakteristike u svim smjerovima, omogućavajući smjernice za rast duž višestrukih osi; i C) Topografski gradijenti, koji pružaju smjernice za rast kroz postupne promjene u fizičkim značajkama, kao što je razmak između linija ili stupića, duž određenog smjera. Modificirano prema (63).

Intrinzična svojstva neurona variraju, stoga ista topografska podloga može imati različit utjecaj na rast i morfologiju neurona, ovisno o tipu neurona i životinjskoj vrsti iz koje su izolirani (93, 101, 110-112). Primjerice, istraživanje Hansona i suradnika otkrilo je da hipokampalni neuroni sisavaca, kada se uzgajaju na podlogama sa stožastim stupićima, uspostavljaju kontakt s tim stupićima i koriste ih kao vodiče za rast. Suprotno tome, neuroni izolirani iz druge životinjske vrste (*Aplysia californica*) pokazuju tendenciju izbjegavanja kontakta sa stupićima (101). Također, dimenzije neurona mogu se razlikovati na mikrometarskoj skali, a različite substancične komponente poput aksona, dendrita, rastućih konusa, lamelipodija i filopodija variraju u veličini, čineći neurone posebno osjetljivima na topografske značajke uzgojne podloge. Aksoni, posebno, pokazuju veću osjetljivost i dinamičnost na mikrometarske topografske strukture u usporedbi s onima nanometarskih dimenzija (80).

Pri izradi raznovrsnih umjetnih podloga koriste se brojni materijali, među kojima su polimeri poput polidimetilsiloksana (PDMS) te metali poput silicija. Dok se sintetički i prirodni polimeri češće upotrebljavaju u stvaranju uzgojnih podloga s kontinuiranim linijama, silicij je materijal izbora za podloge sa strukturama okomitih stupića. Silicijske uzgojne podloge s mikroigličastim strukturama (engl. *micro-pillar substrates*, MPS), upotrebene u ovoj disertaciji, demonstrirale su kompleksnost interakcija između neurona i topografskih značajki podloge, čime su pridonijele istraživanjima odgovora hipokampalnih neurona (95, 97, 98, 113), neurona spiralnog ganglija (96, 99) i staničnih linija PC12 (114) na topografske podražaje.

1.3. Elektrofiziološke tehnike za snimanje neurona

Za proučavanje električnih svojstava pojedinačnih neurona kao i načina obrade informacija unutar neuronskih mreža, koriste se različite elektrofiziološke metode. Ove standardne metode mogu se kategorizirati u dvije glavne skupine: 1) unutarstanične tehnike snimanja, koje uključuju korištenje oštih elektroda (115) ili „patch-clamp“ elektroda (116), i 2) tehnike izvanstaničnog snimanja, koje se izvode pomoću pojedinačnih elektroda (117) ili višestrukih elektroda integriranih na multi-elektrodne čipove (118).

1.3.1. Unutarstanične tehnike snimanja

Unutarstanično snimanje obuhvaća mjerenje napona ili struje kroz membranu stanice, pružajući uvid u transmembranske procese. Kada se snima membranski napon kao odgovor na ubrizganu struju putem elektrode za snimanje, proces se naziva „current clamp“. S druge strane, „voltage clamp“ odnosi se na mjerenje ionske struje koja prolazi kroz elektrodu za snimanje dok se membranski napon drži na konstantnoj vrijednosti. Ova dva temeljna načina snimanja omogućavaju analizu ključnih karakteristika neurona, uključujući njihov odgovor na sinaptički ulaz od drugih stanica (vidljiv iz oblika vala i amplitude struje potrebne za iniciranje akcijskog potencijala), intrinzične obrasce aktiviranja neurona (engl. *firing patterns*) (vidljive iz broja i frekvencije akcijskih potencijala koji nastaju kao odgovor na depolarizirajući impuls), te dinamiku ionskih kanala (koja se analizira kroz promjene u ionskoj struji u odnosu na membranski napon) (119).

Standardni postav za unutarstanično snimanje uključuje referentnu elektrodu uronjenu u izvanstaničnu otopinu elektrolita i intracelularnu elektrodu, koja je zapravo tanka staklena pipeta napunjena unutarstaničnom otopinom elektrolita. Ova pipeta dolazi u kontakt sa stanicom i povezana je s metalnom žicom (obično srebrnom s presvlakom srebrnoga klorida), koja vodi do pojačala. Pojačalo služi za mjerenje razlike potencijala između intracelularne i referentne elektrode te za ubrizgavanje struje. Također, spojeno je na razne elektroničke uređaje poput osciloskopa i na računalo koje bilježi mjerenja i omogućuje slanje određenih naredbi, kao što je ubrizgavanje struje (120).

Postoje dvije vrste intracelularnih elektroda – oštre (engl. *sharp*) elektrode i „patch“-elektrode. Tradicionalno unutarstanično snimanje koristi oštre elektrode s vrlo malim vrhom (0.01-0.1

μm) koje se umeću u unutrašnjost stanice, što dovodi do oštećenja membrane (120). Također, brtvljenje (engl. *seal*) stanične membrane oko oštre elektrode nije potpuno, što uvodi dodatnu struju propuštanja (engl. *leak current*) koja ulazi u stanice i mijenja napon odnosno membranski potencijal preko membrane (119, 121). To objašnjava zašto je membranski potencijal mirovanja viši kada se mjeri oštrim elektrodama, u usporedbi s onim dobivenim od patch-elektroda (122). Dodatno, otpor elektrode je obrnuto proporcionalan promjeru njezina vrha, pa tako oštre elektrode s tankim vrhom imaju veći otpor (oko $100\text{ M}\Omega$). Visok otpor može stvarati poteškoće u mjerenjima budući da je impedancija slična ili čak veća od ulaznog otpora neurona, što dovodi do neslaganja između izmjerenog i stvarnog membranskog napona (119). Osim toga, oštre elektrode karakterizira veća nelinearnost zbog različitosti u otopinama na vrhu elektrode i više razine šuma (123).

Za razliku od snimanja pomoću oštrih elektroda, whole-cell patch-clamp snimanje (još uvijek bez opće prihvaćenog hrvatskog izraza) koristi patch-elektrode, koje su također staklene pipete, ali s puno širim otvorom na vrhu ($1\text{-}2\ \mu\text{m}$). To rezultira znatno nižim otporom elektrode ($3\text{-}5\text{ M}\Omega$) (119), omogućavajući direktno snimanje električnih signala iz cijelog neurona uz minimalni gubitak signala (122). Nizak otpor elektrode pruža preciznu kontrolu nad membranskim naponom bez značajnih električnih distorzija, rješavajući problem mjerenja napona koji se javlja kod oštrih elektroda visokog otpora. Za razliku od oštrih elektroda koje se umeću u stanicu, patch-elektroda se čvrsto pričvršćuje na površinu stanične membrane, stvarajući čvrsto brtvljenje (engl. *tight seal*) s otporom većim od $1\text{ G}\Omega$ (tzv. giga-ohm seal) putem negativnog tlaka primijenjenog kroz vrh elektrode. Time se izbjegava dodatna struja propuštanja i održava nepromijenjen membranski potencijal (119).

Prednosti patch-clamp metode u odnosu na tradicionalne tehnike snimanja (120) učinile su je "zlatnim standardom" za snimanje električne aktivnosti neurona na staničnoj razini (124). Ova metodologija zahtjeva vrlo preciznu optičku, mehaničku i elektroničku opremu, kao i spretnost, jer konfiguracija „whole-cell“ uključuje probijanje stanične membrane, pa otopina elektrolita iz patch-elektrode difundira u stanicu, postupno zamjenjujući unutarstanični sadržaj (tzv. dijaliza stanice), što može s vremenom izmijeniti intrinzična svojstva stanice (120).

Iako tehnike unutarstaničnog snimanja, bilo korištenjem patch-elektroda ili oštrih elektroda, pružaju iznimno precizne elektrofiziološke podatke o stanici s odličnim omjerom signala prema šumu (engl. *signal-to-noise ratio*, SNR), one su invazivne i stoga ograničavaju vijek trajanja

stanica. To čini dugotrajne eksperimente teško ostvarivim. Osim toga, ovakve metode ne omogućuju simultano praćenje velikog broja stanica, što ih čini manje pogodnima za istraživanje dinamike velikih neuronskih mreža (125).

1.3.2. Izvanstanične tehnike snimanja

Kako bi se prevladala ograničenja unutarstaničnih tehnika snimanja, opsežno su se počela koristiti izvanstanična snimanja električne aktivnosti neurona pomoću mikro-elektrodnih čipova (engl. *micro-electrode arrays*, MEA). Ova metoda omogućava istovremeno i dugotrajno snimanje znatno većih populacija neurona, kao i aktivno upravljanje neuronskom aktivnošću putem kontrolirane električne stimulacije neurona, koristeći strujne krugove integrirane izravno na čip. Neuron se za ovakva snimanja uzgajaju direktno na površini čipa, a njihova električna aktivnost, odnosno akcijski potencijali, generiraju električno polje ili promjenu napona koja se snima izvanstaničnom mikro-elektrodom u neposrednoj blizini neurona (126). Izvanstanični akcijski potencijali karakterizirani su kratkim, izmjeničnim promjenama napona između elektrode za snimanje i elektrode za uzemljenje, s bifaznim, negativno-pozitivnim oblikom vala (127, 128), što se razlikuje od unutarstaničnih akcijskih potencijala koji pokazuju inicijalni pozitivan pa negativan šiljak. Dok se unutarstanični AP-i mjere u milivoltima, izvanstanični AP-i obično se mjere u mikrovoltima.

Jedna od ključnih prednosti izvanstaničnog snimanja je njegova neinvazivnost; stanična membrana ostaje netaknuta, omogućujući mjerenja koja mogu trajati sate, pa čak i dane ili mjeseci (126). Izvanstanične tehnike ne zahtijevaju precizno pozicioniranje elektrode na staničnoj membrani kao kod unutarstaničnih snimanja budući da se izvanstanični AP može detektirati kada se elektroda postavi u blizini mjesta nastanka AP-a, obično oko tijela neurona ili u blizini početnog segmenta aksona (129, 130).

Izvanstanično snimanje može se provesti kao tradicionalno snimanje jednom elektrodom (131, 132), što ograničava snimanje na manji broj stanica, ili korištenjem čipova s više elektroda koji mogu simultano zabilježiti izvanstaničnu aktivnost velikog broja neurona (133). Međutim, najveći nedostatak ovih tehnika jest sposobnost snimanja aktivnosti pojedinačnih stanica kvalitetom usporedivom s unutarstaničnim snimanjem. Naime, višestruke izvanstanične elektrode bilježe promjene u protoku struje ne samo od najbližeg neurona, već i od udaljenijih,

susjednih stanica, često rezultirajući ograničenim omjerom signala i šuma te nejasnoćom u određivanju izvora signala. Također, izvanstanične elektrode ne mogu detektirati događaje ispod aktivacijskog praga, poput sinaptičkih potencijala ili membranskih oscilacija, koji mogu utjecati na podražljivost stanice bez stvaranja akcijskog potencijala. Ovi nedostaci otežavaju interpretaciju višestaničnih zapisa i zahtijevaju složenu analizu snimljenih podataka kako bi se razlikovali pojedinačni signali i postigli konzistentni rezultati (127, 134).

1.3.3. Tehnologija mikro-elektrodnih čipova

Višestanična snimanja se često provode pomoću mikro-elektrodnih čipova (MEA), koji nalaze primjenu u biomedicinskim istraživanjima i osnovnim znanstvenim studijama za dobivanje izvanstaničnih elektrofizioloških informacija o biološkim sustavima s visokom razlučivošću u prostoru i vremenu. MEA tehnologija postala je standard u brojnim neuroznanstvenim laboratorijima kao glavna metoda za simultano, neinvazivno snimanje izvanstaničnih polja potencijala generiranih akcijskim potencijalima iz velikog broja neurona u dugotrajnim *in vivo* i *in vitro* eksperimentima (128, 134). Osim toga, MEA uređaji nude dvosmjernu funkcionalnost, omogućavajući ne samo snimanje aktivnosti neurona nego i njihovu stimulaciju, bilo strujnim ili naponskim podražajima, izazivajući tako odgovor neurona (135).

Glavne komponente MEA sustava obuhvaćaju: 1) vodljivi izvanstanični volumen unutar kojeg se stvara električno polje; 2) supstrat s ugrađenim mikroelektrodama; i 3) hardver (uključujući pojačala, filtere, digitalizatore, stimulare itd.) povezan s elektrodama (128). Razni MEA sustavi su dostupni za izvanstanična elektrofiziološka snimanja. Pasivni MEA sustavi, koji se tipično sastoje od metalnih elektroda na staklenoj ili silicijskoj podlozi, ograničeni su po broju elektroda i prostornoj razlučivosti, što je ključno za detaljnu rekonstrukciju velikih neuronskih mreža (136). Nasuprot tome, napredak u mikro/nano elektronici omogućio je razvoj komplementarnih metal-oksidnih poluvodičkih mikro-elektrodnih čipova (engl. *complementary metal-oxide semiconductor micro-electrode arrays*, CMOS-MEA), koji pružaju visoku prostorno-vremensku razlučivost zahvaljujući gustoj raspodjeli elektroda na površini čipa, dobru kvalitetu signala ili omjer signala prema šumu, te laku upotrebu uz pomoć korisnički prilagođenog softvera (135).

CMOS-MEA sustavi s velikom gustoćom elektroda (HD-MEA) nude mogućnost mapiranja aktivnosti kompletnih neuronskih mreža na staničnoj, pa čak i sub-staničnoj razini, otkrivajući tako detalje stanične signalizacije, poput praćenja širenja akcijskih potencijala duž aksona kultiviranih neuroni (137-139). Osim snimanja elektrofizioloških događaja, CMOS-MEA sustavi također se mogu koristiti kao biosenzori za detekciju biokemijskih događaja, na primjer, u otkrivanju molekula osjetljivih na farmaceutike *in vitro* (140). MEA uređaji pokazali su se uspješnima u snimanju aktivnosti iz različitih bioloških uzoraka, uključujući kultivirane kardiomiocyte, neuronske kulture, rezove mozga i eksplantate mrežnice, omogućujući detaljniji uvid u biološke procese (128, 135). Sve ove karakteristike čine MEA sustave svestranom platformom za širok spektar bioloških primjena, od temeljnih istraživanja do primijenjene znanosti i industrije.

2. CILJEVI I HIPOTEZE

Istraživanja koja uključuju morfološke i elektrofiziološke analize neurona uzgojenih na trodimenzionalnim platformama ili uzgojnim podlogama ključne su kako bi se osiguralo da takve 3D podloge ne ometaju homeostazu i funkciju neurona te umjesto toga potiču željeni rast, morfologiju i kontrolirano topografsko vođenje neurita kultiviranih neurona, prije njihovog širokog usvajanja u razna biomedicinska područja. Ova linija istraživanja posebno je važna za razvoj sofisticiranih elektrofizioloških uređaja poput CMOS mikro-elektrodnih čipova (CMOS-MEA), koji omogućuju neinvazivnu, istovremenu stimulaciju i elektrofiziološko snimanje velikog broja neurona koji leže na površini čipa. Osim istraživanja promijenjenih elektrofizioloških svojstava neurona spinalnog ganglija u patološkim stanjima, kao što je neuropatska bol, ovu tehnologiju moguće je primijeniti i u istraživanjima na substaničnoj razini kako bi se otkrile pojedinosti stanične signalizacije, pa tako i širenje akcijskih potencijala duž aksona uzgojenih neurona u istraživanju filtracijskih svojstava T-spoja neurona spinalnog ganglija.

Nužan preduvjet za uspješno korištenje ove tehnologije je morfološka i elektrofiziološka karakterizacija neurona uzgojenih na 3D topografskim podlogama, poput onih s okomitim mikro-igličastim strukturama, koje imitiraju 3D elektrode na CMOS-MEA čipovima. Slijedom navedenog, primarni ciljevi ove doktorske disertacije su:

- Istražiti kako topografija mikro-igličastih podloga utječe na raspodjelu i morfologiju neurona spinalnog ganglija.
- Istražiti kako topografija mikro-igličastih podloga utječe na elektrofiziološka svojstva neurona spinalnog ganglija.

Sekundarni ciljevi uključuju:

- Analizirati rast i raspodjelu neurona spinalnog ganglija na različitim topografijama mikro-igličastih podloga u usporedbi s kontrolnim ravnim staklenim podlogama (podlogama bez topografije).
- Analizirati morfologiju, odnosno usmjerenost, dužinu i broj neurita neurona spinalnog ganglija na različitim topografijama mikro-igličastih podloga naspram kontrolnih podloga.
- Analizirati parametre akcijskih potencijala i okidanje akcijskih potencijala neurona spinalnog ganglija na mikro-igličastim podlogama u odnosu na kontrolne ravne podloge.

Hipoteze istraživanja su sljedeće:

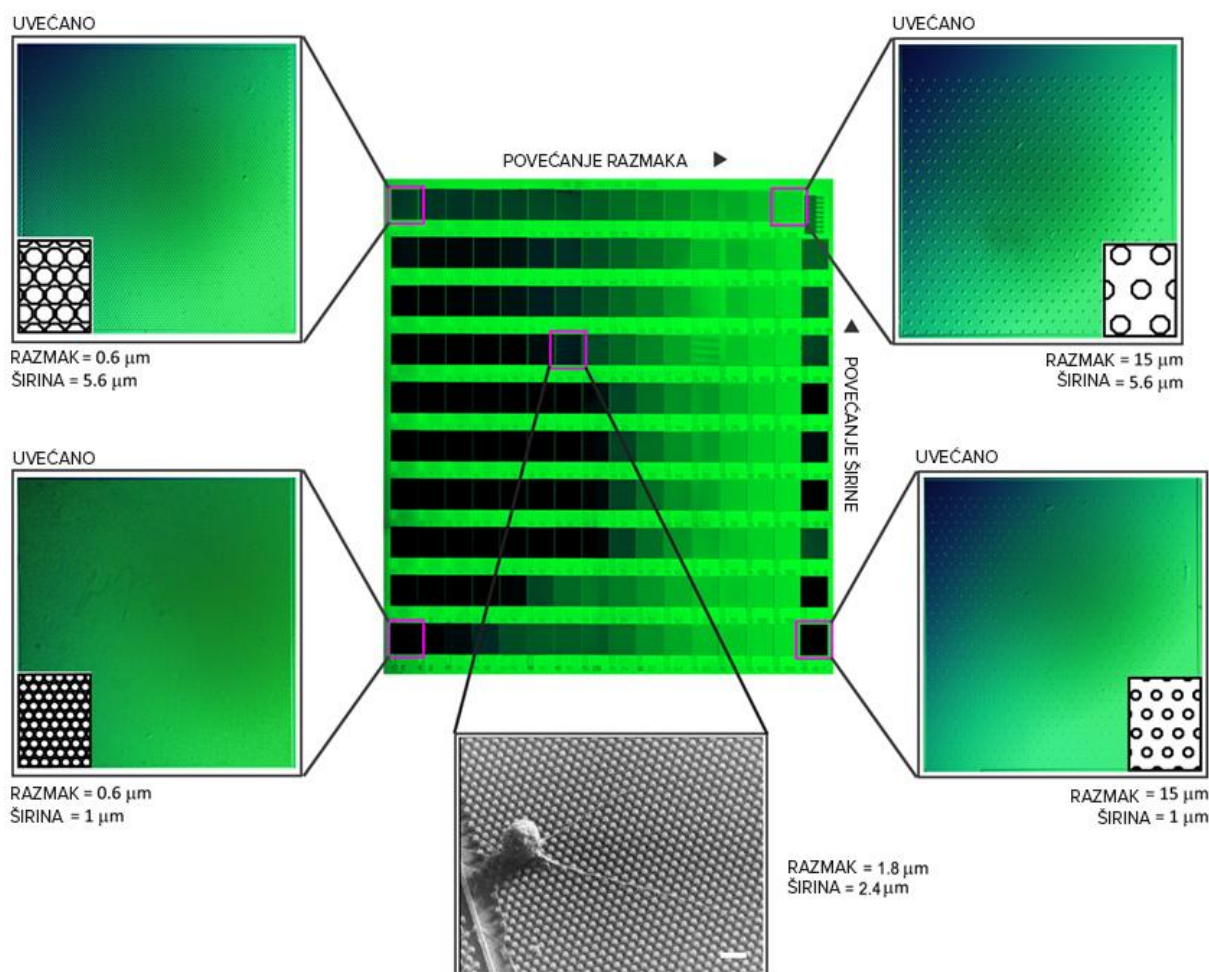
- Topografija mikro-igličastih podloga utječe na raspodjelu neurona spinalnog ganglija tako da se veći broj neurona nalazi na specifičnim područjima mikro-igličastih podloga, ovisno o veličini i gustoći struktura. Broj neurona na mikro-igličastim podlogama usporediv je s onim na kontrolnim ravnim podlogama.
- Morfologija neurona spinalnog ganglija je pod utjecajem topografije mikro-igličastih podloga; u određenim područjima s posebnim dimenzijama i gustoćom struktura, neuroni pokazuju usmjereniji rast neurita, dulje neurite i manju razgranatost neurita u usporedbi s ostalim dijelovima mikro-igličastih podloga i s kontrolnim podlogama.
- Elektrofiziološka svojstva neurona spinalnog ganglija ostaju očuvana na mikro-igličastim podlogama; neuroni uzgojeni na mikro-igličastim podlogama posjeduju slične parametre akcijskih potencijala i sličnu sposobnost okidanja akcijskih potencijala kao i neuroni uzgojeni na kontrolnim ravnim podlogama, što ukazuje na očuvanje funkcionalnog integriteta neurona uzgojenih na mikro-igličastim podlogama.

3. MATERIЈALI I METODE

3.1. Izrada i dizajn mikro-igličastih podloga

Trodimenzionalne mikro-igličaste podloge (engl. *micro-pillar substrates*, MPS) za uzgoj stanica *in vitro* izrađene su od silicija u sterilnim uvjetima u IMEC-u (Leuven, Belgija) prema prethodno opisanom postupku (97). Ukratko, sloj oksida niske temperature nanesen je na standardnu silicijsku pločicu promjera 8 inča, nakon čega je uslijedilo pečenje na 455°C te definiranje područja mikro-igličastih struktura standardnom fotolitografijom s promjerima u rasponu od 1-5.6 μm i razmacima između struktura u rasponu od 0.6-15 μm . Zatim je upotrijebljeno reaktivno ionsko jetkanje (engl. *reactive ion etching*, RIE) za stvaranje struktura visine 3 μm , a preostali fotorezistentni sloj uklonjen je uranjanjem podloga u smjesu 'Piranha' (1:3 H_2O_2 : H_2SO_4). Zasebne MPS podloge izrezane su iz silicijskih pločica u veličini od 8x8 mm^2 i korištene za staničnu kulturu.

Dobivene mikro-igličaste podloge organizirane su na način da sadrže 150 pojedinačnih polja sa 3D igličastim strukturama šesterokutnog oblika raspoređenih u 15 stupaca i 10 redaka, odvojenih glatkim područjima. Svako polje ima strukture jednake širine i razmaka (izotropna topografija), dok između polja širina i razmak struktura varira. Polja u svakom redu imaju jednaku širinu igličastih struktura, dok razmak među strukturama varira u rasponu od 0.6 do 15 μm između polja. Polja u svakom stupcu imaju jednak razmak između igličastih struktura, dok širina struktura varira od 1 do 5.6 μm između polja. Visina struktura je 3 μm . Ovaj poseban dizajn, detaljno prikazan na Slici 5, pruža ogroman broj topografski različitih okruženja na jednoj podlozi, što nam omogućuje istraživanje odgovora neurona na širok raspon različitih topografija.



Slika 5. Organizacija topografije mikro-igličastih uzgojnih podloga. MPS podloga sadrži 150 polja sa igličastim heksagonalnim strukturama veličine reda mikrona organiziranih u 10 redaka i 15 stupaca. Razmak između igličastih struktura postepeno se povećava između polja svakog reda, odnosno slijeva na desno, u rasponu od 0.6 do 15 μm (specifično: 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2, 2.4, 3.2, 4, 5, 7, 10, 15 μm). Širina mikro-igličastih struktura postepeno se povećava između polja svakog stupca, od dolje prema gore, u rasponu od 1 do 5.6 μm (specifično: 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2, 2.4, 2.8, 4, 5.6 μm). Visina igličastih struktura je konstantna i iznosi 3 μm .

3.2. Priprema uzgojnih podloga za staničnu kulturu

Prije nasađivanja stanica, silicijske MPS podloge su očišćene acetonom preko noći, sterilizirane u 70%-tnom etanolu i osušene na zraku u laminaru. Kontrolne planarne podloge - staklena pokrovna stakalca (13 mm; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) sterilizirana su u autoklavu na 120°C tijekom 20 minuta. I MPS i kontrolne podloge su zatim

stavljene u posude s 24 jažice (TPP, Trasadingen, Švicarska), te je na svaku podlogu dodano 0,2 mg/ml poli-L-lizina (PLL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD, kat. br. P1274) i ostavljeno na sobnoj temperaturi preko noći, kako bi se podržala adhezija stanica. Idućeg dana, PLL otopina je uklonjena, a podloge su isprane sterilnom vodom i osušene na zraku pod sterilnim uvjetima.

3.3. Pokusne životinje

Istraživanja su provedena na mladim mužjacima štakora soja Sprague-Dawley, tjelesne mase 170-250 g, starosti 1-2 mjeseca, te na neonatalnim štakorima, starosti 5-7 dana. Životinje su uzgojene u Nastambi za pokusne životinje Sveučilišta u Splitu u kontroliranim uvjetima. Smještene su u plastičnim kavezima s piljevinom i kukuruznom steljom, u parovima, s hranom i vodom dostupnom *ad libitum*, temperaturom $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, te ciklusima 12 sati dan i 12 sati noć.

Etička načela: Svi pokusi i protokoli na životinjama odobreni su od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu te Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede (dozvola broj HR-POK-022) te su slijedili etičke smjernice Međunarodne udruge za proučavanje boli (IASP).

3.4. Kirurški postupak izolacije spinalnih ganglija

Kirurški zahvat izolacije spinalnih ganglija iz odraslih štakora izveden je u inhalacijskoj anesteziji induciranoj s 5% izoflurana u kisiku (Forane, Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, UK, kat. br. B506), a zatim održavanoj s 2% izoflurana u kisiku. Nakon središnjeg reza kroz kožu i dva bočna reza kroz mišiće, lumbalni dio kralježnice je izložen. Mišićno tkivo u okolini je uklonjeno i kralježnica otvorena dok gangliji nisu bili jasno vidljivi. Lijevi i desni L4 i L5 spinalni gangliji su pažljivo izvađeni i stavljani u ledeno hladnu Hankovu uravnoteženu otopinu soli (engl. *Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS; bez kalcija/magnezija, Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD, kat. br. 14170-146) gdje su preostali živci i vezivno tkivo pažljivo uklonjeni pod stereomikroskopom.

Kirurški zahvat izolacije spinalnih ganglija iz neonatalnih štakora izveden je nakon hladne anestezije i eutanazije dekapitacijom. Kralježnica je uklonjena iz štakora i prebačena u ledeno hladnu otopinu HBSS-a. Nakon čišćenja preostalog tkiva, kralježnica je otvorena rezanjem kroz dorzalne kralješke kako bi se izložila leđna moždina. Svaki spinalni ganglij pažljivo je odvojen od leđne moždine uklanjanjem od membrana i rezanjem korijena što je moguće bliže gangliju.

3.5. Kultura neurona spinalnog ganglija

Postupak enzimske i mehaničke razgradnje tkiva spinalnih ganglija te stanična kultura, odnosno uzgoj neurona spinalnog ganglija *in vitro*, bio je identičan za spinalne ganglije izolirane iz odraslih i neonatalnih štakora. Postupak enzimske razgradnje tkiva izveden je inkubiranjem spinalnih ganglija u Dulbeccovom modificiranom Eagle mediju (engl. *Dulbecco's modified Eagle medium*, DMEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD, kat. br. 31966-021) koji sadrži 0.07% tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD, kat. br. T9935), 0.01% Liberase TM (Roche, Basel, Švicarska, kat. br. 05401119001) i 38 U/ml DNaze I (Roche, Basel, Švicarska, kat. br. 10104159001), na 37°C tijekom 60 minuta u vibracijskoj vodenoj kupelji. Enzimska razgradnja prekinuta je dodavanjem 0.25% inhibitora tripsina (Roche, Basel, Švicarska, kat. br. 10109886001) u DMEM-u, a preostali fragmenti ganglija mehanički su razgrađeni trituracijom uskim Pasteurovim pipetama sve dok stanična suspenzija nije bila homogena.

Nakon centrifugiranja na 6000 okretaja u minuti tijekom 6 minuta, stanični talog je resuspendiran u 1 ml prethodno zagrijanog (37°C) medija za uzgoj stanica sastavljenog od Neurobasal-A medija (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD, kat. br. 10888-022) u kombinaciji s 2% B27 dodatka (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD, kat. br. 17504-044), 0.5 mM L-glutamina (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD, kat. br. 25030-081), 0.02 mg/ml gentamicina (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD, kat. br. 15750-060) i 100 ng/ml 7S-čimbenika rasta živaca (engl. *nerve growth factor*, NGF; Corning, NY, SAD, kat. br. 354009). Stanice su izbrojane koristeći Bürker-Türkovu komoricu, nakon čega je stanična suspenzija nanosena na prethodno pripremljene mikro-igličaste i kontrolne uzgojne podloge, smještene u posude s jažicama, u volumenu od 100 µl (5000-15000 stanica) po uzgojnoj podlozi (n=3 MPS podloge; n=3

kontrolne podloge po jednoj staničnoj kulturi). Nakon perioda inkubacije od 10-15 minuta (37°C, 5% CO₂), što olakšava pričvršćivanje stanica za podlogu, u svaku je jažicu s uzgojnom podlogom i stanicama dodan po 1 ml prethodno zagrijanog (37°C) medija za uzgoj, nakon čega su uzgojne podloge sa stanicama vraćene u inkubator (37°C, 5% CO₂) i kultivirane 1, 3 ili 7 dana za morfološke analize, odnosno 24-48 sati za elektrofiziološke analize.

3.6. Metodologija za morfološku analizu neurona

3.6.1. Imunocitokemija i fluorescentna mikroskopija

Nakon 1., 3. i 7. dana u staničnoj kulturi (engl. *days in vitro*, DIV), neuroni uzgojeni na mikroigličastim i kontrolnim podlogama fiksirani su 4% paraformaldehidom u 0.01 M fosfatnom puferu (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS; pH = 7.4) 20 minuta na sobnoj temperaturi. Fiksirane stanice zatim su isprane tri puta s PBS-om, te 0.1% Triton X-100 (Millipore, Billerica, MA, SAD) u PBS-u tijekom 10 minuta kako bi se permeabilizirala stanična membrana. Za blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela, stanice su inkubirane u 4% kozjem ili magarećem serumu (Dako, Glostrup, Danska) u 0.1% Triton X-100 PBS-u tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi. Zatim je dodana mješavina primarnih protutijela anti-NeuN u kombinaciji s jednim od primarnih protutijela ili konjugata za identifikaciju specifičnih podtipova neurona spinalnog ganglija (anti-NF200 - klon N52, anti-CGRP ili anti-IB4; pojedinosti o primarnim protutijelima i konjugatima navedeni su u Tablici 1). Nakon inkubacije preko noći na 4°C u vlažnoj komori na tamnom mjestu, stanice su isprane tri puta otopinom 0.1% Triton X-100 u PBS-u, tretirane odgovarajućim sekundarnim protutijelima i konjugatima (pojedinosti u Tablici 1) tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi te inkubirane s 5 µg/ml DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) u PBS-u tijekom 2 minute na sobnoj temperaturi u mraku kako bi se obojile stanične jezgre. Stanice su konačno isprane još tri puta otopinom 0.1% Triton X-100 u PBS-u. Uzorci su zatim pripremljeni za mikroskopiju koristeći tekućinu Shandon Immu-Mount (Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, SAD) i pohranjeni na 4°C do daljnje analize.

Slike su dobivene pomoću fluorescentnog mikroskopa Olympus BX51 (Tokyo, Japan) opremljenog digitalnom kamerom Olympus DP71 (Tokyo, Japan) pomoću računalnog programa Cell A Imaging Software (Olympus, Tokyo, Japan) Fluorescentne slike stanica i neurita snimljene su za svako protutijelo (ili konjugat) koristeći odgovarajuće filtere za

selektivno detektiranje zelene i crvene fluorescencije. Sve slike su snimljene u RGB modu boja u 24-bitnom TIFF formatu i rezoluciji 1360 x 1024 piksela.

Tablica 1. Korištena protutijela i konjugati

| | <i>Meta</i> | <i>Proizvođač; kat.br. (lot.br.)</i> | <i>Razrjeđenje</i> |
|---|---|---|--------------------|
| Primarna protutijela | | | |
| <i>Poliklonsko protutijelo protiv neuronskog jezgrinog antigena (NeuN) razvijeno u kuniću</i> | Svi neuroni (141) | Sigma-Aldrich; SAB 4300883 (480132093) | 1:500 |
| <i>Monoklonsko protutijelo protiv neurofilamenta 200 kDa (NF200), klon N52, razvijeno u mišu</i> | Neuroni spinalnog ganglija s mijeliniziranim A-vlaknima (31) | Millipore; MAB 5266 (2567008) | 1:300 |
| <i>Poliklonsko protutijelo protiv peptida vezanog za gen kalcitonina (CGRP), razvijeno u kozi</i> | Peptidergički neuroni spinalnog ganglija s mijeliniziranim A- i nemijeliniziranim C-vlaknima (43) | Santa Cruz Biotechnology; sc-8856 (F1714) | 1:300 |
| Sekundarna protutijela | | | |
| <i>Kozje protutijelo usmjereno na IgG kunića, označeno fluorescentnom bojom Texas Red</i> | | Santa Cruz Biotechnology; sc-2780 (B1914) | 1:600 |
| <i>Kozje protutijelo usmjereno na IgG miša, označeno biotinom</i> | | Santa Cruz Biotechnology; sc-2039 (B2614) | 1:600 |
| <i>Magareće protutijelo usmjereno na IgG kože, označeno fluorescentnom bojom FITC (fluorescein izotiocijanat)</i> | | Santa Cruz Biotechnology; sc-2024 (D0114) | 1:600 |
| Konjugati | | | |
| <i>Izolektin B4 (IB4), označen fluorescentnom bojom FITC (fluorescein izotiocijanat)</i> | Nepeptidergički neuroni spinalnog ganglija s nemijeliniziranim C-vlaknima (46) | Sigma-Aldrich; L 2895 (052M4086V) | 1:100 |

Streptavidin DyLight 488 konjugat

Abcam; 1:600
ab134349
(GR224458-1)

3.6.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Uzgojeni neuroni spinalnog ganglija fiksirani su 4% paraformaldehidom u 0.01 M PBS-u tijekom 20 minuta, te isprani tri puta PBS-om i tri puta destiliranom vodom tijekom 5 minuta. Nakon toga, uzorci su dehidrirani serijom razrjeđenja etanola u vodi, kako slijedi: 25% otopina etanola (5 minuta) - 50% otopina etanola (10 minuta) - 75% otopina etanola (10 minuta) - 95% otopina etanola (10 minuta) - apsolutni etanol (100%) tijekom 10 minuta, tri puta, i zatim ostavljeni da se osuše. Uzorci su vizualizirani i fotografirani pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa JEOL JSM-5200 (Tokio, Japan). Slike su spremljene kao TIFF datoteke.

3.6.3. Analiza rasta i raspodjele neurona na uzgojnim podlogama

Imunofluorescentni NeuN pozitivni neuroni spinalnog ganglija brojani su pod fluorescentnim mikroskopom na svakom uzorku kontrolnih staklenih podloga i mikro-igličastih podloga nakon 1 DIV, 3 DIV i 7 DIV. Jednak uzorak rasta uočen je nakon svih ispitanih dana u kulturi; stoga je za analizu odabrana i prikazana prisutnost neurona nakon 3 DIV. Najprije je procijenjena topografija mikro-igličastih podloga (Slika 5), odnosno utjecaj područja MPS-a sa specifičnom organizacijom igličastih struktura na rast i raspodjelu neurona. Nakon brojanja neurona smještenih na svakom od 150 pojedinačnih područja MPS-a, izračunat je njihov postotak u svakom području MPS-a te je izračunat prosjek u 5 neovisnih eksperimenata s neuronima iz odraslih štakora (n=1011) i 5 neovisnih eksperimenata s neuronima iz neonatalnih štakora (n=1966 neurona). Rezultati su prikazani kao funkcija širine i razmaka mikro-igličastih struktura koristeći SigmaPlot softver (Systat Software, San Jose, SAD) kako bi se dobila preferencijalna raspodjela neurona preko površine MPS-a, ako postoji. Prema razmaku između mikro-igličastih struktura, MPS je podijeljen na tri okomita odjeljka (1. odjeljak: 0.6–1.4 μm ; 2. odjeljak: 1.6–3.2 μm ; 3. odjeljak: 4–15 μm), dok je prema širini mikro-igličastih struktura podijeljen na tri vodoravna odjeljka (1. odjeljak: 2.8–5.6 μm ; 2. odjeljak: 1.6–2.4 μm ; 3. odjeljak: 1–1.4 μm).

Zatim je procijenjena gustoća kultiviranih neurona spinalnog ganglija na okomitim i vodoravnim odjeljcima MPS-a i kontrolnim staklenim podlogama te uspoređena između različitih MPS odjeljaka i kontrole. Apsolutni broj neurona po svakom okomitem i vodoravnom odjeljku MPS-a izražen je kao postotak ukupnog broja neurona i podijeljen s površinom (30.8 mm² za svih 150 područja MPS-a, točnije 10.3 mm² za svaki okomiti odjeljak, 9.3 mm² za 1. i 3. vodoravni odjeljak te 12.3 mm² za 2. vodoravni odjeljak) predstavljajući relativni broj stanica po mm². Ukupan broj neurona uzgojenih na kontrolnom staklu također je normaliziran površinom koja je iznosila 132.7 mm². Za rezultate je uzet prosjek od 5 neovisnih kultura neurona odraslih štakora (ukupno n=1011 neurona uzgojenih na površinama MPS-a i n=1406 neurona na staklenim kontrolnim podlogama), te 5 kultura neonatalnih neurona (ukupno n=1966 neurona na MPS podlogama i n=1841 neurona na kontrolnom staklu).

3.6.4. Morfometrijska analiza dužine i broja neurita

Kako bi se procijenio učinak topografije mikro-igličastih podloga na morfologiju neonatalnih i odraslih neurona spinalnog ganglija, morfometrijske analize dužine neurita, broja neurita i usmjerenosti neurita provedene su upotrebom NIH-ImageJ softvera (verzija 1.50, Bethesda, SAD).

Za kvantificiranje prosječne dužine neurita svakog neurona u različitim odjeljcima MPS-a (okomito i vodoravno) i različitim vremenskim točkama (1 DIV i 3 DIV) korišten je dodatak ImageJ softvera, "NeuronJ" (verzija 1.4.3). Mjerenje dužine neurita nakon 7 DIV nije bilo moguće zbog vrlo dugih i isprepletenih neurita koji su izlazili iz vidnog polja. Neuriti uzgojeni na staklenim podlogama korišteni su kao kontrola. Slike fluorescentnih neurona s prepoznatljivim neuritima, svima unutar vidnog polja, učitane su u softver u obliku 8-bitnih slika u sivim tonovima (engl. *grayscale*) i kalibrirane prema povećanju slike. Prosječna dužina neurita pojedinog neurona dobivena je ručnim praćenjem dužine svakog pojedinačnog neurita od njegovog izlaza iz staničnog tijela do njegovog završetka, podijeljena s ukupnim brojem neurita po neuronu. Dužine neurita i ukupan broj neurita stavljeni su u prosjek za sve neurone pojedinog odjeljka MPS-a ili kontrolne staklene podloge. Ukupno je analizirano n = 194 slika neonatalnih i n = 189 slika adultnih neurona, s najmanje 15 slika po svakom odjeljku MPS-a i kontrolnom staklu.

Redoslijed naredbi u ImageJ softveru opremljenom dodatkom “NeuronJ”:

- 1) Odaberite “Plugins” > “NeuronJ” > kliknite na žutu mapu i odaberite 8-bitnu sliku u sivim tonovima (engl. *grayscale*) za analizu (prethodno pretvorenu iz fluorescentne (RGB) slike pomoću Adobe Photoshop softvera i spremljenu kao TIFF datoteka).
- 2) Odaberite “Analyze” > “Set scale”: za povećanje slike od 20x, postavite “Distance in pixels” na 320 i “Known distance” na 200; za povećanje od 40x, postavite “Distance in pixels” na 315 i “Known distance” na 100. Kliknite “Global” kada imate slike s istim povećanjem u nizu.
- 3) Odaberite gumb “Add tracings”. Zatim kliknite na sliku gdje neurit počinje i pratite ga do kraja (na kraju dvostruko kliknite za završetak).
- 4) Nakon što iscrtate sve neurite analiziranog neurona, kliknite na gumb “Measure tracings”, odaberite “Display tracing measurements” i kliknite “Run” kako biste dobili tablicu koja sadrži podatke o dužini neurita.
- 5) Na kraju, spremite sliku sa svim iscrtanim neuritima kao novu TIFF datoteku.

3.6.5. Morfometrijska analiza usmjerenosti neurita pomoću algoritma “Fast Fourier Transformation” (FFT)

Osim analize broja i dužine neurita, procijenjena je i usmjerenost neurita neonatalnih i adultnih neurona spinalnog ganglija uzgojenih na mikro-igličastim i kontrolnim staklenim podlogama koristeći algoritam “Fast Fourier Transform” (FFT). FFT funkcija pretvara informaciju o prostoru i smjeru prisutnu na izvornoj slici u matematički definiranu frekvencijsku domenu. Rezultirajuća FFT izlazna slika preslikava brzinu kojom se intenziteti piksela mijenjaju preko izvorne slike, dajući nam informacije o orijentaciji objekata prisutnih u slici (142). Drugim riječima, ukoliko na izvornoj slici ne postoji usmjerenje struktura (npr. neurita), izlazna FFT slika pokazat će konstantan intenzitet piksela, bez vrhova, što ukazuje na nepostojanje specifičnog usmjerenja. Nasuprot tome, izvorna slika koja sadrži strukture usmjerene u jednom smjeru imat će veći intenzitet piksela duž tog smjera, što se na izlaznoj FFT slici iscertava kao vrh u tom smjeru (143).

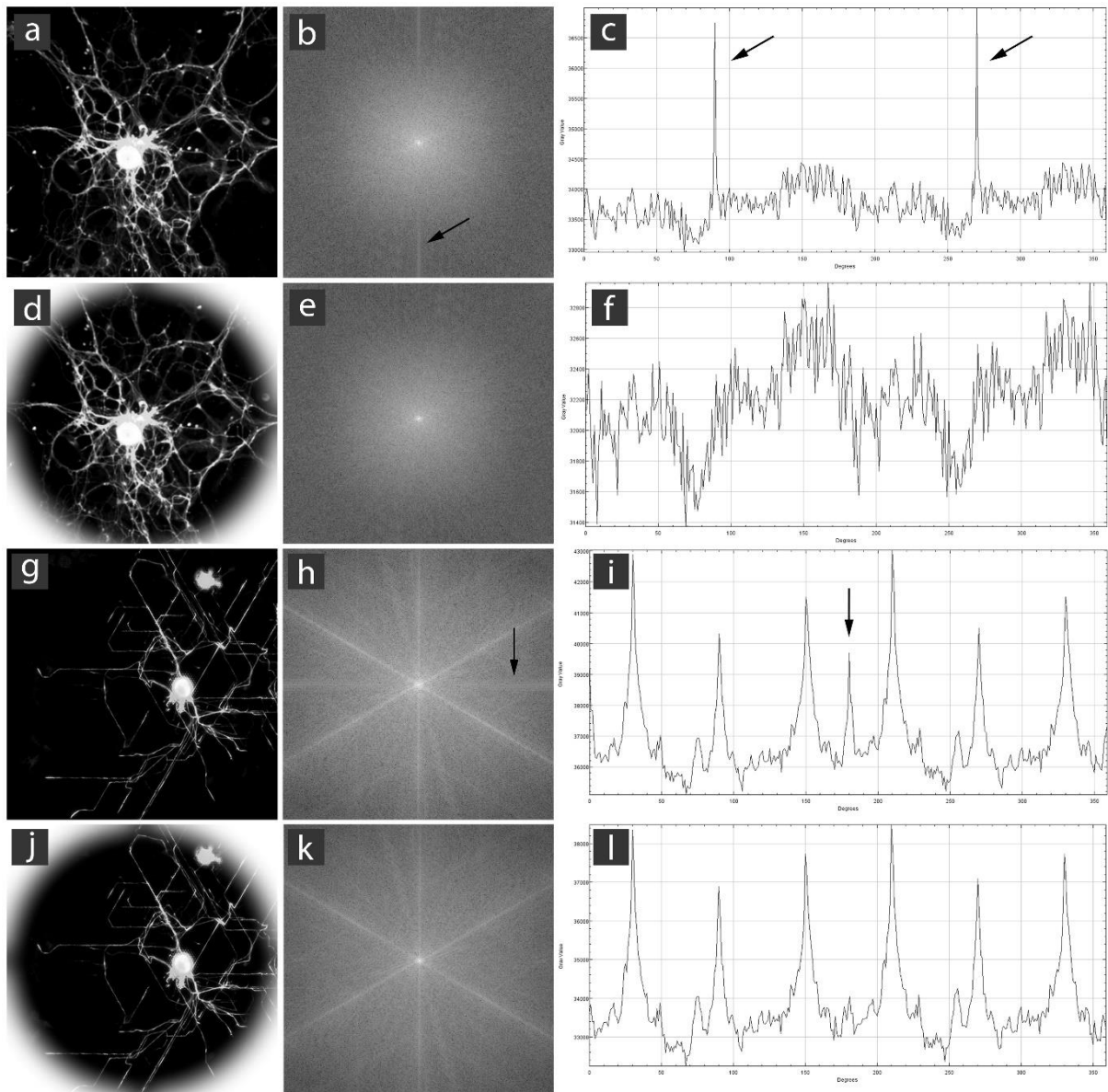
Usmjerenost neurita smatra se jednom od najvažnijih mjera u većini *in vitro* studija koje ispituju odgovor neurona na nametnutu topografiju uzgojnih podloga. Također, analiza usmjerenosti neurita važna je i za elektrofiziološka snimanja te za biotehnologiju zbog pružanja informacija o usmjeravanju rasta neurita u željenom smjeru (79). S obzirom na to, proširili smo analizu usmjerenosti neurita i na podtipove neurona spinalnog ganglija, kako iz adultnih tako i iz neonatalnih štakora. Kvantifikacija usmjerenosti neurita u našem eksperimentu postignuta je izvođenjem FFT analize koristeći dodatak "Oval profile" softvera NIH-ImageJ (autor Bill O'Connell, <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/oval-profile.html>). Ovdje je važno napomenuti da uhodana i pouzdana metodologija za mjerenje usmjerenosti neurita ne postoji. Stoga smo za ovu analizu definirali novu metodologiju (u nastavku teksta precizno opisanu, uključujući i komande za izvođenje) koristeći protokol koji kombinira nekoliko softverskih rješenja koja pružaju preciznu i brzu metodu za određivanje smjera neurita (144).

Za svaku podvrstu neurona spinalnog ganglija, snimljeno je 15 digitalnih fotografija imunofluorescentno obojenih neurita (obilježenih antitijelima/konjugatima protiv N52, IB4 ili CGRP) po svakom odjeljku MPS-a (u tripletima, odnosno po tri slike za svako područje jednake topografije), kao i po svakoj kontrolnoj staklenoj podlozi (ukupno n=180 slika adultnih i n=180 slika neonatalnih neurona). Slike su pretvorene u 8-bitne TIFF datoteke u sivim tonovima (engl. *grayscale*) pomoću softvera Adobe Photoshop CS3 (Adobe Photoshop CS3, Adobe Systems Incorporated, San Jose, SAD) i izrezane na 512x512 piksela. Budući da FFT uvijek tretira sliku kao da je dio periodično ponavljajućeg niza identičnih slika koje se protežu u beskonačnost, pojavit će se jaki rubni efekti te stvoriti lažni vrhovi na grafovima usmjerenja neurita (142). Kako bi se ti efekti eliminirali, na svaku je sliku prije analize (Slika 6 d, j) potrebno primijeniti masku (engl. *radial feather mask*) u Adobe Photoshop softveru.

Pripremljene slike zatim su obrađene FFT funkcijom softvera ImageJ kako bi se stvorila FFT slika (frekvencijski dijagram; Slika 6 b, e, h, k). FFT metoda u potpunosti pretvara prostorne informacije slike (piksele) u frekvencijsku domenu, rastavljanjem slike na sinuse i kosinuse različitih amplituda i faza. Na taj su način izvorni podaci u potpunosti sačuvani. Proizvedeni frekvencijski dijagram FFT-a sastoji se od piksela različitih frekvencija koji su raspoređeni na različitim udaljenostima i u različitim smjerovima od središta slike, s pikselima niske frekvencije u središtu i visoke frekvencije na rubu slike. Općenito, pikseli niske frekvencije predstavljaju cjelokupan oblik ili uzorak na slici i kao takvi sadrže najviše informacija o slici, dok pikseli visoke frekvencije pružaju više informacija o detaljima slike, ali također odgovaraju

naglim varijacijama na slici i sadrže više šuma. Stoga, detalji, rubni efekti i pozadinski šum u analiziranoj slici doprinose stvaranju piksela visoke frekvencije (142). Ako slika sadrži nasumične neurite, kao one na kontrolnim staklenim podlogama (Slika 6 a, d), rezultirajući frekvencijski dijagram sadrži piksele niske frekvencije u blizini središta s pikselima visoke frekvencije raspršenima oko središta (Slika 6 b, e). Ukoliko se prije FFT analize na sliku ne stavi maska (Slika 6 a), dolazi do pojave snažne okomite linije piksela visoke frekvencije kroz središte frekvencijskog dijagrama (Slika 6 b, strelica označava šum), kao i lažnih vrhova na dijagramu usmjerenosti neurita (Slika 6 c, strelice), što je pokazatelj postojanja rubnih efekata. No, ukoliko se prije analize na sliku stavi maska (Slika 6 d), dolazi do slabljenja rubnih efekata, te gubitka okomite linije piksela visoke frekvencije, odnosno šuma (Slika 6 e), kao i nestajanja lažnih vrhova (Slika 6 f). Informacija o usmjerenim neuritima na izvornoj slici, kao što su neuriti na mikro-igličastim podlogama (Slika 6 g, j), prikazana je frekvencijskim dijagramom koji sadrži piksele visoke frekvencije koncentrirane duž određene osi (Slika 6 h, k). Ponovno, primjenom maske (Slika 6 j) lažne informacije (Slika 6 h, i, strelica) se filtriraju (Slika 6 k, l).

Podaci iz FFT slike su zatim ekstrahirani pomoću dodatka ImageJ softvera, "Oval Profile", na način da se intenziteti piksela zbrajaju duž radijusa za svaki kut ($0-360^\circ$) kako bi se dobio FFT dijagram usmjerenosti neurita (Slika 6 c, f, i, l). FFT dijagram usmjerenosti nasumičnih neurita, bez preferencijalnog usmjerenja, trebao bi izgledati kao kontinuirano promjenjiv trag bez specifičnih vrhova, kao što je prikazano na Slici 6 f. Ukoliko se slika obrađuje bez primijenjene maske generirat će se artefakti u obliku lažnih vrhova (Slika 6 c, strelice) koji izravno odgovaraju okomitoj liniji piksela visoke frekvencije vidljivih na frekvencijskom dijagramu (Slika 6 b, strelica). Suprotno tome, FFT dijagram usmjerenosti neurita sa preferencijalnim smjerom duž određene osi sadržavat će karakterističan trag vrhova koji predstavlja stupanj usmjerenosti prisutan u izvornoj slici (Slika 6 l). Viši i uži vrhovi ukazuju na ujednačeniji stupanj usmjerenosti neurita. Položaj vrhova ili kut usmjerenja predstavljaju glavnu os smjera u kojem neuriti rastu na uzgojnim podlogama. FFT dijagram usmjerenosti slike koja je obrađena bez primjene maske također će sadržavat artefakte, odnosno lažne vrhove (Slika 6 i). Grafički prikaz rezultata dobiva se zbrajanjem intenziteta piksela duž svakog stupnja između 0° i 180° . Budući da je FFT dijagram simetričan prikaz do 360° nije potreban (145).



Slika 6. FFT analiza slika neurona koji sadrže nasumične neurite (a-f) i usmjerene neurite (g-l) koristeći dodatak "Oval profile" softvera NIH-ImageJ. Analiza slika bez maske (engl. *radial feather mask*) (a, g) proizvodi artefakte, odnosno lažne vrhove (označene strelicama na slici b, c, h, i) uzrokovane rubnim efektima. Postavljanjem maske na izvornu sliku (d, j) vidljivo je odsustvo artefakata, odnosno nestajanje lažnih vrhova (e, f, k, l), kako na FFT frekvencijskom dijagramu (e, k) tako i na dijagramu usmjerenosti neurita (f, l).

Detaljni koraci pripreme slika za FFT analizu:

1) Snimite slike imunofluorescentno obojenih neurita spinalnog ganglija pod fluorescentnim mikroskopom koristeći objektiv 20X. U slučaju slika neurona uzgojenih na mikro-igličastim podlogama, nakon snimanja fluorescentne slike željenog neurona, snimite i površinu MPS-a na kojoj se neuron nalazi koristeći diferencijalni interferencijski kontrast (DIC) zbog vidljivosti vodoravnih i okomitih rubova svakog polja MPS-a (koji se ne mogu vidjeti na fluorescentnim slikama). Spremite snimljene slike u TIFF formatu.

NAPOMENA: Treba paziti da se maksimalno smanji pozadinski šum micanjem pozadine tijekom snimanja slike i/ili kasnije u softveru Adobe Photoshop.

2) U Adobe Photoshop-u, stvorite novu sliku klikom na "File" sa širinom i visinom od 512 x 512 piksela i rezolucijom od 72 piksela po inču. Odaberite 8-bitnu sliku u sivim tonovima (engl. *grayscale*) iz opcije "Color mode option" i kliknite OK.

3) Na alatnoj traci s lijeve strane ekrana (odaberite "Window > Tools" da biste otvorili alatnu traku, ako nije otvorena prema zadanim postavkama) pritisnite i držite tipku miša na alatu "Rectangular Marquee Tool" (drugi alat s vrha). Pojavit će se padajući izbornik s dodatnim alatom. Odaberite "Elliptical Marquee Tool". Na traci opcija odaberite stil kao "Fixed Size" s dimenzijama širine i visine od 512 x 512 piksela. Kliknite na sliku i povucite krug u središte slike (koristeći tipke sa strelicama na tipkovnici).

4) Zatim postavite masku na sliku, odnosno omekšajte rubove slike (stvorite "vignette effect") odabirom "Windows > Mask". U donjem desnom kutu pojavit će se opcije maske. Kliknite na ikonu koja označava "Add a pixel mask". Parametar "Density", koji kontrolira prozirnost maske, ostavite na zadanoj vrijednosti od 100%. Da biste dobili meke rubove, parametar "Feather radius" stavite na 20 piksela.

5) Nakon što je kružna maska gotova, spremite je kao novu sliku u TIFF formatu (možete je nazvati "Predložak"). Ovaj se "Predložak" ponovno koristi za primjenu maske na sve slike.

6) Otvorite obje, sliku predložka i željenu sliku neurona u Photoshop-u. Sada kopirajte željenu sliku i zalijepite je na sliku predložka (na vašoj slici kliknite "Select > All", "Edit > Copy", a zatim "Edit > Paste" na sliku predložka). Upotrijebite "Move Tool" za podešavanje područja slike kojeg želite analizirati.

NAPOMENA: U slučaju slika snimljenih s mikro-igličastih podloga, prvo otvorite DIC sliku područja na kojem se neuron nalazi i imunofluorescentnu sliku tog neurona. Kopirajte DIC sliku i zalijepite je na fluorescentnu sliku. Kako su sada vidljive vodoravne i okomite rubne linije željenog područja MPS podloge, rotirajte sliku sve dok vodoravna linija ne bude paralelna s donjim djelom ekrana, a okomita linija s bočnom stranom ekrana.

7) Odaberite “Window > Layers” (uvjerite se da je “Layer 1” odabran). Zatim kliknite i držite kružnu masku iz “Layer 0” (slika bijelog kruga na crnoj pozadini s desne strane slike predloška) i povucite je i ispustite na željenu sliku (“Layer 1”). Posljednji korak je spremanje trenutne slike s primijenjenom maskom kao nove TIFF datoteke (Slika 6 d, j).

Detaljni koraci FFT analize:

1) Otvorite spremljenu sliku (s primijenjenom maskom) u softveru NIH ImageJ (“File > Open”). Zatim odaberite na traci izbornika: Process > FFT > FFT kako biste generirali FFT sliku (Slika 6 b, e, h, k).

2) Primijenite analizu “Oval Profile” na FFT slici koristeći ikonu elipse na glavnoj alatnoj traci. Da biste definirali i fiksirali radijus prstena, dvostruko kliknite na ikonu elipse. Kada se otvori prozor “Selection Brush”, unesite željenu veličinu (511 piksela u našem slučaju) i odaberite “Enable selection brush”. Kliknite FFT sliku i povucite prsten u središte slike (koristeći tipke sa strelicama na tipkovnici).

3) Na traci izbornika odaberite “Plugins > Oval Profile”. Postavite “Number of points” na 360 te “Analysis mode” na “Radial Sums”.

4) Novo kreirani graf usmjerenosti neurita (engl. *Radial Sum Intensity graph*, Slika 6 c, f, i, l) prikazuje periodične promjene u intenzitetu piksela pod svakim kutom usmjerenja. Kliknite na "List" da biste vidjeli vrijednosti intenziteta piksela (u stupcu Y) za svih 360 kutova (u stupcu X) i kopirajte ih.

5) Zalijepite vrijednosti intenziteta piksela i kutove u prva dva stupca Microsoft Excel-a. U stupcu A pojavit će se svi kutovi od 0 do 359, kao i vrijednosti radijalnih suma intenziteta piksela u stupcu B. U sljedećem stupcu trebate pronaći minimalnu vrijednost među svim vrijednostima radijalnih suma intenziteta za svih 360 kutova. Zatim oduzmite te minimalne

vrijednosti od svake vrijednosti radijalnog intenziteta kako biste dobili razlike u intenzitetima piksela između kutova. Posljednji korak je umetanje tih vrijednosti u graf pomoću softvera Origin (verzija X).

3.7. Metodologija za elektrofiziološku analizu neurona

Za karakterizaciju elektrofizioloških parametara neurona spinalnog ganglija uzgojenih na mikro-igličastim i kontrolnim staklenim podlogama korišteno je patch-clamp snimanje cijele stanice (engl. *whole-cell patch-clamp*) u načinu rada “current-clamp”. Snimanja su obavljena nakon 24 do 48 sati u staničnoj kulturi, na sobnoj temperaturi, koristeći EPC-8 patch-clamp pojačalo kontrolirano Patchmaster softverom.

3.7.1. Patch-clamp sustav

Zbog neprozirnosti mikro-igličastih podloga, sastavljen je prilagođeni patch-clamp sustav temeljen na uspravnom mikroskopu BX-52 (Olympus, SAD) s pomičnim postoljem po x-, y- i z-osi, te s fiksnim objektivom velike radne udaljenosti. Kako bi se smetnje uzrokovane vibracijama i električnim šumom svele na najmanju moguću mjeru, mikroskop je fiksiran na anti-vibracijski stol i okružen Faradayevim kavezom. Patch-pipete izrađene su od borosilikatnih staklenih kapilara s filamentima (vanjskog promjera 1.5 mm, unutarnjeg promjera 0.86 mm; Sutter Instrument, Novato, CA, SAD, kat. br. BF150-86-10) korištenjem P-97 uređaja za izradu pipeta (Sutter Instrument, Novato, CA, SAD) opremljenog s filamentom od 2.5 x 2.5 mm (Sutter Instrument, Novato, CA, SAD, kat. br. FB255B). Nakon toga, pipete su polirane toplinom pomoću uređaja za taljenje (engl. *microforge*; Narishige, Tokio, Japan) kako vrh pipete ne bi bio oštar. Izrađene pipete imale su otpor od 3–6 MΩ. Distalni kraj svake pipete zatim je napunjen unutarstaničnom otopinom koristeći štrcaljku i finu, dugu iglu spojenu na filter s porama od 0.2 μm. Pipeta je montirana na HEKA “headstage”, njeno pomicanje kontrolirano je motoriziranim mikromanipulatorom (HEKA Elektronik GmbH, Njemačka). Elektrofiziološki zapisi snimljeni su u konfiguraciji “whole-cell” koristeći HEKA EPC-8 patch-clamp pojačalo (HEKA Electronic, Lambrecht, Njemačka) i PatchMaster softver (verzija 2.53; HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Njemačka).

3.7.2. Elektrofiziologija

Nakon razdoblja inkubacije od 24-48 sati, snimljeni su kultivirani adultni neuroni spinalnog ganglija unutarstaničnom tehnikom “whole-cell patch-clamp”. Medij za uzgoj je uklonjen, a stanice su potom prebačene u komoru za snimanje postavljenu na uspravni mikroskop. Komora je napunjena izvanstaničnom otopinom (37°C), koja se sastojala od 140 mM NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. 31434), 4 mM KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. P4504), 2 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. 746495), 2 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. M8266), 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. H3375) i 10 mM glukoze (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. G8270). pH je podešen na 7.4 pomoću NaOH, a osmolarnost je bila ~300 mOsm.

Unutarstanična otopina pipete sastojala se od 120 mM KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. P4504), 5 mM Na-ATP (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. A2383), 0.4 mM Na-GTP (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. G8877W), 5 mM EGTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. 03779), 2.25 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. 746495), 5 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. M8266) i 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. H3375). pH je podešen na 7.2 pomoću KOH, a osmolarnost je bila ~290 mOsm.

Sva snimanja provedena su na sobnoj temperaturi od 23 ± 2°C. Promjer tijela neurona kretao se između 15-30 µm. Nakon što je uspostavljeno čvrsto brtvljenje (engl. *tight seal*) s otporom većim od 1 GΩ (engl. *giga-ohm seal*), napon naredbe (engl. *command voltage*) postavljen je na -70 mV kako bi se simulirao membranski potencijal mirovanja i minimizirali elektrokemijski poremećaji nakon probijanja stanične membrane. Kapacitivnost pipete (engl. *pipette capacitance*) je elektronički kompenzirana. Nakon uspostavljanja “whole-cell” konfiguracije, membranski potencijal mirovanja ostavljen je da se stabilizira nekoliko minuta prije mjerenja. Akcijski potencijali (AP) izazvani su dvjema vrstama struje: kratkim (100 ms) za određivanje potrebnih AP parametara i dugim (500 ms) za mjerenje broja AP. Kako bi se osigurala točnost rezultata, neuroni koji su pokazali ulazni otpor manji od 100 MΩ nakon postizanja “whole-cell” konfiguracije ili neuroni koji su pokazali visoku struju propuštanja (engl. *leak current*; > 0,5 nA pri potencijalu zadržavanja -70 mV) ili su pokazivali bilo koje drugo vidljivo pogoršanje tijekom okidanja akcijskih potencijala, isključeni su iz analize.

3.7.3. Analiza elektrofizioloških podataka

Analiza elektrofizioloških podataka provedena je korištenjem softverskih paketa: Clampfit 10.3 (Molecular Devices, San Jose, CA, SAD), Microsoft Excel (Redmond, WA, SAD) i GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD). Neuronu su uključeni u analizu samo ako su zadovoljili određene kriterije, uključujući membranski potencijal mirovanja (RMP) od -30 mV ili više negativan, na temelju prethodnih otkrića koja sugeriraju da su varijable AP-a u neuronima spinalnog ganglija slične bez obzira na to je li korištena granica RMP-a od -30 mV ili -40 mV (36). Dodatno, za analizu su uzeti u obzir samo neuroni koji pokazuju prebačaj potencijala (engl. *overshooting AP*) s amplitudom od 50 mV ili većom. Kriterij negativne naknadne hiperpolarizacije isključen je iz analize zbog njegove tipične upotrebe u unutarstaničnim snimanjima intaktnih spinalnih ganglija *ex vivo*, umjesto u patch-clamp snimanjima disociranih stanica (146).

3.8. Statistički postupci

Statističke analize provedene su kako bi se utvrdila značajnost dobivenih rezultata. Podaci dobiveni nakon morfoloških analiza u softverima ImageJ, SigmaPlot, Origin te Microsoft Excel, analizirani su statističkim programom GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD). Razlike između dviju skupina testirane su pomoću Studentovog t-testa. Analiza višestrukih usporedbi izvedena je korištenjem jednosmjerne ANOVA-e, a zatim s Bonferroni *post-hoc* testom. P vrijednosti manje od 0.05 smatrane su statistički značajnima. Varijacije u podacima izražene su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM).

Podaci dobiveni nakon elektrofizioloških analiza u softverima Clampfit 10.3 i Microsoft Excel prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM) te podvrgnuti Mann-Whitney U testu za usporedbu. Razine značajnosti postavljene su na $P < 0.05$. Kako bi se uspostavila kontrolna referenca, elektrofiziološki i morfološki podaci dobiveni od neurona kultiviranih na silicijskim mikro-igličastim podlogama uspoređeni su s onima kultiviranim na staklenim planarnim podlogama.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati morfološke analize neurona

Cilj prve studije bio je istražiti rast i raspodjelu neurona spinalnog ganglija te njihovu morfologiju, odnosno usmjerenost, dužinu i broj neurita na različitim topografijama silicijskih mikro-igličastih podloga te na kontrolnim staklenim ravnim podlogama, tj. podlogama bez prisustva topografije.

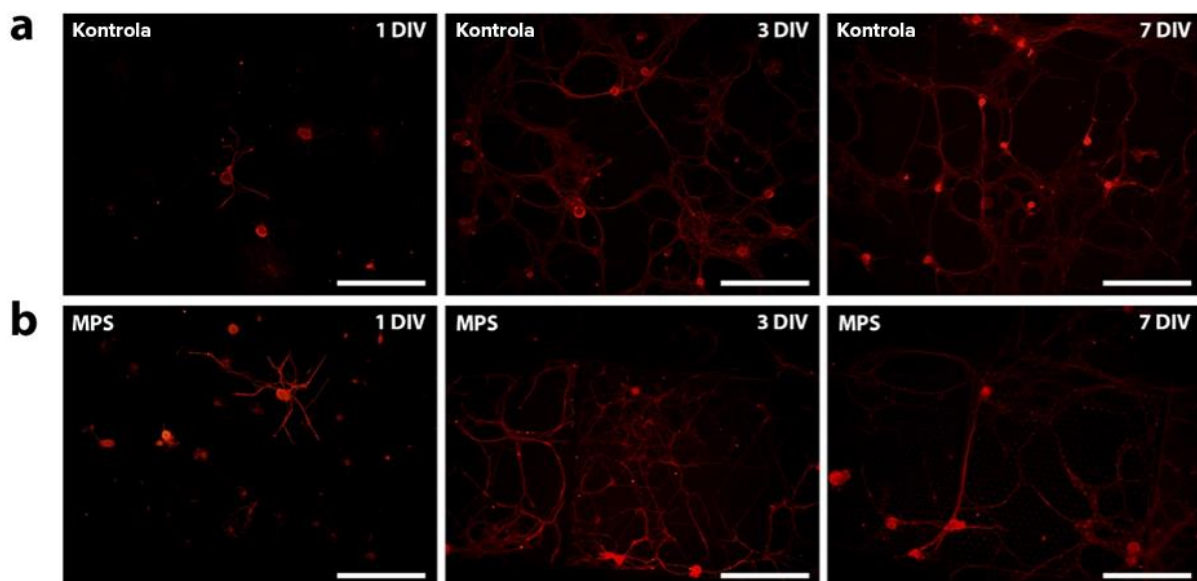
4.1.1. Rast i raspodjela neurona spinalnog ganglija na mikro-igličastim podlogama

Neuroni spinalnog ganglija, izolirani iz neonatalnih i adultnih štakora, kultivirani su na silicijskim mikro-igličastim uzgojnim podlogama (MPS) s različitim topografskim strukturama te uspoređeni s kontrolnim neuronima kultiviranim na konvencionalnim ravnim podlogama, odnosno podlogama bez topografije, izrađenima od borosilikatnog stakla. Kultivirani neuroni spinalnog ganglija čvrsto su prianjali na površinu MPS podloga i nisu se lako odvajali tijekom promjene medija i postupaka bojanja. Neuroni s rastućim neuritima bili su prisutni i na kontrolnom staklu i na MPS podlogama, nakon 1., 3. i 7. dana u kulturi (Slika 7 a, b). Jednak uzorak rasta primijećen je nakon svih ispitanih dana u kulturi; stoga je za analizu izabrana i prikazana prisutnost neurona nakon 3. dana *in vitro*.

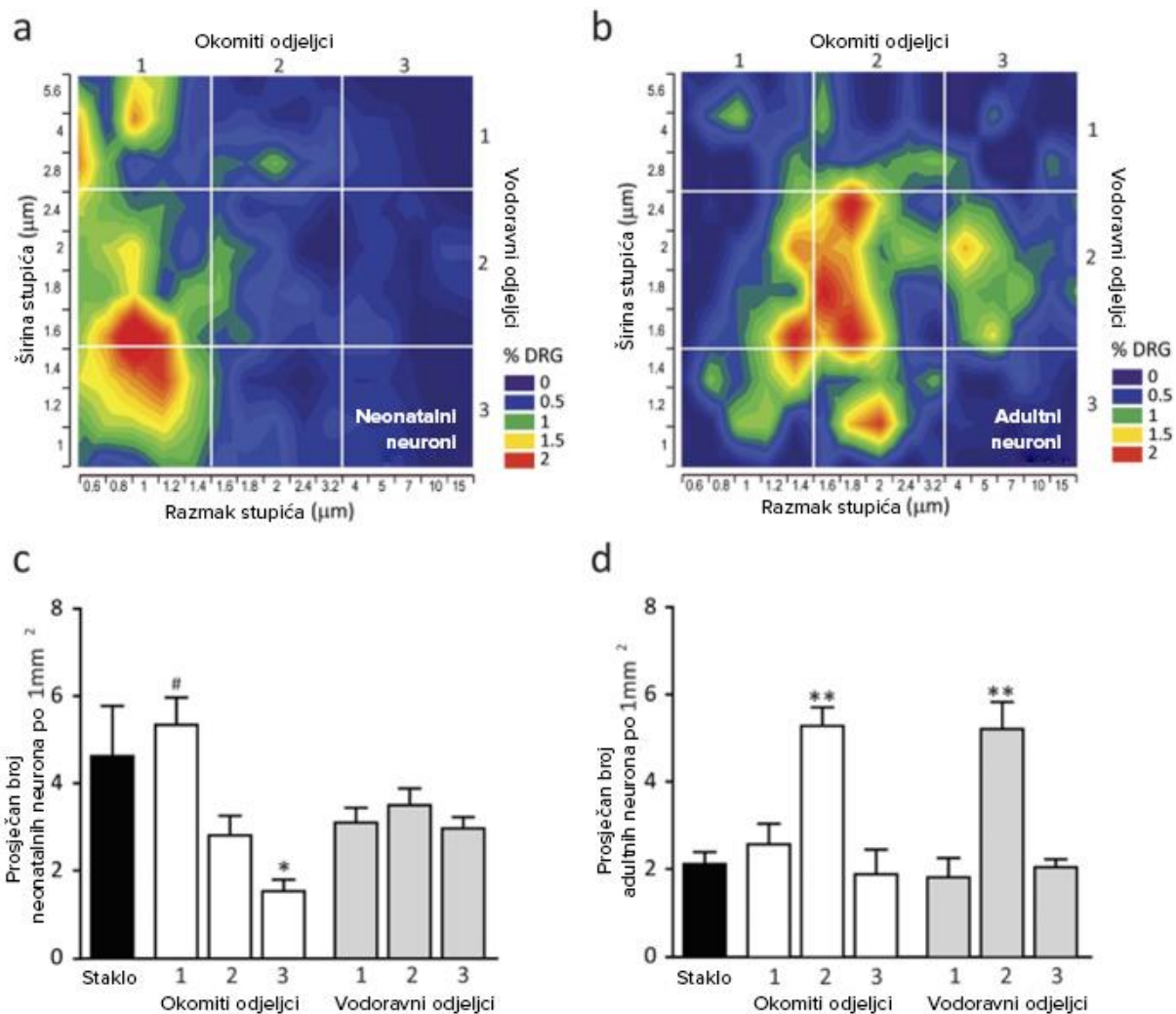
Kako bi se istražio utjecaj topografije 3D mikro-igličastih uzgojnih podloga na preferencijalni rast neurona spinalnog ganglija, površina MPS podloga podijeljena je u tri okomita odjeljka (prema razmaku između mikro-igličastih struktura) i tri vodoravna odjeljka (prema širini mikro-igličastih struktura) (Slika 8). Nakon prebrojavanja i izračunavanja postotka NeuN pozitivnih neurona na svakom od 150 topografski različitih područja MPS podloga iz pet neovisnih eksperimenata s adultnim neuronima (n=1011) te pet neovisnih eksperimenata s neonatalnim neuronima (n=1966 neurona), dobiven je površinski dijagram raspodjele neonatalnih (Slika 8a) i adultnih (Slika 8b) neurona spinalnog ganglija, kao funkcija širine i razmaka mikro-igličastih struktura. Otkriveno je da raspodjela neurona nije ravnomjerna po površini MPS podloga, kao što je to slučaj kod konvencionalnih podloga, već i neonatalni i adultni neuroni spinalnog ganglija pokazuju preferencijalan rast na područjima MPS podloga sa specifičnim topografskim značajkama. Neonatalni neuroni spinalnog ganglija (Slika 8a) imali su izraženiji afinitet za područja prvog okomitog odjeljka MPS-a u kojem se nalaze mikro-igličaste strukture s najmanjim međusobnim razmakom (0.6-1.4 μm). Prosječna gustoća neurona u tom području bila je značajno veća nego u preostalim dijelovima MPS-a (Slika 8c).

Zanimljivo, nije bilo značajne razlike u prosječnoj gustoći neonatalnih neurona između vodoravnih odjeljaka, što sugerira da širina mikro-igličastih struktura nema toliko važan učinak na njihov rast kao što to ima razmak između mikro-igličastih struktura. Također, prosječan broj neonatalnih neurona po kvadratnom milimetru bio je značajno veći od gustoće adultnih neurona (4.6 naspram 2.1 po 1 mm²; t-test, P < 0.001).

S druge strane, adultni neuroni spinalnog ganglija uglavnom su se nalazili u središnjoj regiji MPS-a, u područjima drugog okomitog odjeljka (1.6-3.2 μm) i drugog vodoravnog odjeljka (1.6-2.4 μm), sa značajno većom gustoćom neurona u tom području u usporedbi s drugim područjima MPS-a i kontrolnim staklenim podlogama (Slika 8d). S obzirom da je prosječna gustoća neurona na kontrolnim ravnim površinama bila slična gustoći neurona na površinama MPS-a ne-preferencijalnog rasta neurona, možemo zaključiti da topografija mikro-igličastih podloga nema negativan učinak na rast neurona spinalnog ganglija. Štoviše, određene topografske značajke MPS podloga povoljnije utječu na rast neurona spinalnog ganglija *in vitro* u odnosu na kontrolne podloge.



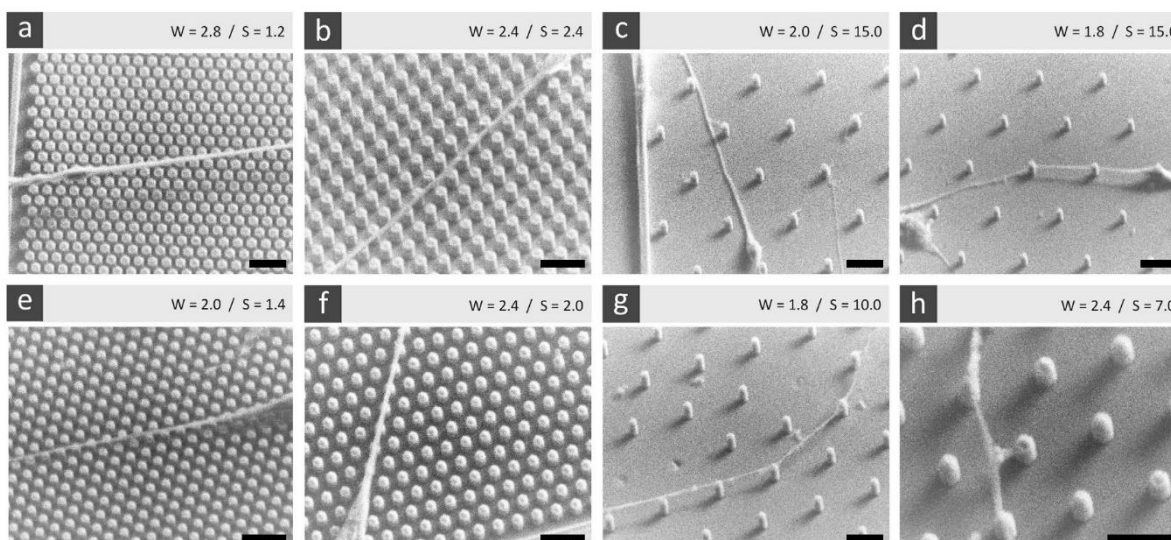
Slika 7. Reprezentativne imunofluorescentne slike NeuN pozitivnih neurona spinalnog ganglija uzgojenih na **a)** kontrolnim staklenim ravnim podlogama i **b)** silicijskim mikro-igličastim podlogama (MPS), nakon 1., 3. i 7. dana u staničnoj kulturi (DIV). Mjerna traka je 200 μm.



Slika 8. Učinci površinske topografije mikro-igličastih podloga (MPS) na rast i raspodjelu neurona spinalnog ganglija *in vitro*. Površinski dijagrami (a) neonatalnih i (b) adultnih neurona nakon 3. dana u staničnoj kulturi prikazuju preferencijalnu raspodjelu neurona na MPS uzgojnim podlogama kao funkcija širine i razmaka mikro-igličastih struktura. Bijele linije označavaju podjelu MPS-a na tri vodoravna (1. odjeljak: 2.8–5.6 μm ; 2. odjeljak: 1.6–2.4 μm ; 3. odjeljak: 1–1.4 μm) i tri okomita odjeljka (1. odjeljak: 0.6–1.4 μm ; 2. odjeljak: 1.6–3.2 μm ; 3. odjeljak: 4–15 μm). Prosječan broj (c) neonatalnih i (d) adultnih neurona po jednom kvadratnom milimetru na okomitim i vodoravnim odjeljcima MPS-a i kontrolnim staklenim podlogama. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SEM. Legenda: # označava značajnu razliku između prvog okomitog odjeljka i dva preostala okomita odjeljka MPS-a; * razlika između staklene podloge i trećeg okomite odjeljka MPS-a; ** razlika između staklene podloge i drugog okomitog i vodoravnog odjeljka (jednosmjerna ANOVA, Bonferronijev post-hoc test,

$P < 0.05$). Rezultati su dobiveni iz pet neovisnih eksperimenata s neonatalnim neuronima ($n = 1966$ neurona na MPS podlogama; $n = 1841$ na staklenim podlogama) te pet neovisnih eksperimenata s adultnim neuronima ($n = 1011$ na MPS podlogama; $n = 1406$ na staklenim podlogama).

Za daljnju vizualizaciju neurona spinalnog ganglija na površini mikro-igličastih podloga, korištena je skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM). Viša rezolucija SEM slika pružila je dodatan uvid u procjenu karakteristika rasta neurona te interakciju neurita sa mikro-igličastim strukturama različitih širina i međusobnog razmaka (Slika 9). U područjima MPS-a s manjim razmakom ($0.6-1.4 \mu\text{m}$) i srednjim razmakom ($1.6-3.2 \mu\text{m}$) između mikro-igličastih struktura, neuriti su imali tendenciju rasta izravno na vrhovima mikro-igličastih struktura, pričvršćujući se za vrhove struktura i prelazeći s jedne strukture na drugu bez kontakta s bazom struktura (Slika 9 a-b, e-f). Kako je razmak između struktura postajao veći ($4-15 \mu\text{m}$), neuriti su počeli prodirati do baze struktura i rasti na ravnim površinama između struktura. Međutim, kontakt sa strukturama nije u potpunosti izgubljen jer neki neuriti pokazuju tendenciju ponovnog "penjanja" na vrhove struktura (Slika 9 c-d, g-h). Ovaj djelomičan gubitak kontaktnog vođenja u područjima MPS-a s većim razmakom između mikro-igličastih struktura dovodi do smanjenja usmjerenosti neurita u ovom određenom području MPS-a. Čini se da uloga mikro-igličastih struktura kao smjernica za rast neurita gotovo isključivo ovisi o razmaku između struktura, a ne o širini struktura, s obzirom da se različiti obrasci rasta neurita (na vrhu i/ili između struktura) mogu vidjeti u područjima MPS-a s jednakom širinom struktura (Slika 9). Opaženo ponašanje bilo je slično i za neonatalne i za adultne neurone spinalnog ganglija.



Slika 9. Interakcije neurita s mikro-igličastim strukturama MPS podloga u odnosu na topografsku organizaciju struktura. Reprezentativne slike (a-d) neonatalnih i (e-h) adultnih neurona spinalnog ganglija na MPS područjima sa strukturama različite širine (W) i međusobnog razmaka (S), dobivene skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). Slike prikazuju tendenciju neurita da slijede vrhove mikro-igličastih struktura s manjim međusobnim razmakom (a-b, e-f), osiguravajući tako usmjereni rast neurita; međutim, s povećanjem razmaka između mikro-igličastih struktura (c-d, g-h), neki neuriti počinju djelomično gubiti kontakt sa strukturama te počinju rasti između njih. Mjerna traka: 10 μm .

4.1.2. Dužina i broj neurita na mikro-igličastim podlogama

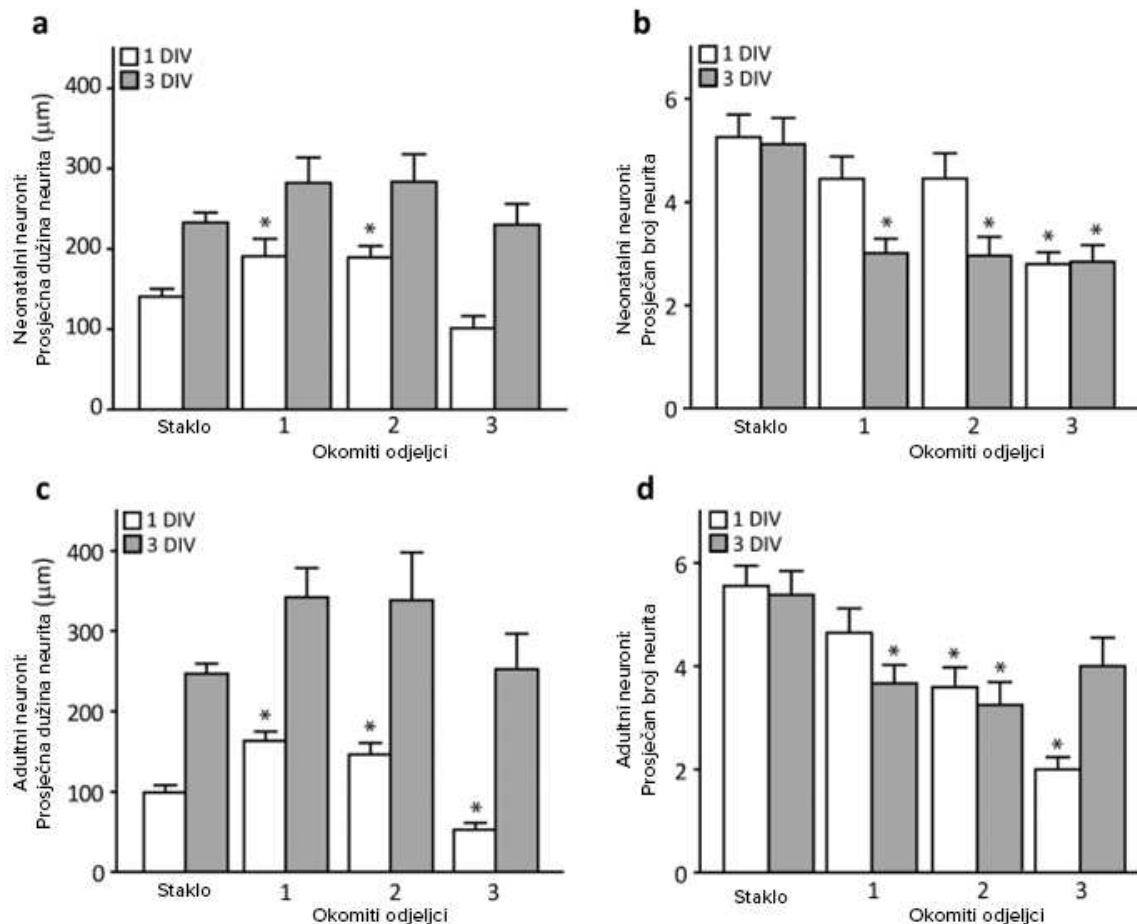
Kako bi se istražio utjecaj topografije mikro-igličastih uzgojnih podloga na morfologiju neurona spinalnog ganglija, provedene su morfometrijske analize dužine i broja neurita te usmjerenosti neurita. Za određivanje prosječne dužine i broja neurita svakog neurona analizirane su imunofluorescentne slike neurona (ukupno $n = 194$ neonatalnih i $n = 189$ adultnih neurona) u različitim vremenskim točkama i različitim odjeljcima MPS podloga kao i kontrolnim staklenim podlogama. Na broj i dužinu neurita značajno je utjecao razmak između mikro-igličastih struktura, ali ne i njihova širina.

Već nakon 1. dana *in vitro* (DIV), neuriti su bili značajno duži u 1. okomitom odjeljku MPS-a (područja s rasponom razmaka između mikro-igličastih struktura od 0.6–1.4 μm) i 2. okomitom odjeljku MPS-a (područja s rasponom razmaka između struktura od 1.6–3.2 μm) u usporedbi

s kontrolnom staklenom površinom, i za neonatalne (jednosmjerna ANOVA, glavni učinak $F(3,76) = 6.725$; $P = 0,0004$) i za adultne (jednosmjerna ANOVA, glavni učinak $F(3,84) = 15.32$; $P < 0,0001$) neurone spinalnog ganglija (Slika 10a i 10c). Nije bilo značajne razlike u dužini neurita između neurona koji su rasli u 1. i 2. okomitom odjeljku MPS-a, međutim, dužina neurita neonatalnih i adultnih neurona koji su rasli u 3. okomitom odjeljku MPS-a (područja s rasponom razmaka između struktura od 4-15 μm) bila je značajno kraća u usporedbi s 1. i 2. okomitim odjeljkom te slična onima na kontrolnim staklenim podlogama bez topografije. Dužina neurita adultnih neurona u 3. okomitom odjeljku bila je čak značajno kraća u usporedbi s neuronima uzgojenim na staklu. Kao što se i očekivalo, nakon 3 DIV, svi su neuriti bili duži nego poslije 1 DIV, ali povećanje dužine je bilo veće za adultne neurone. Međutim, izgubila se značajna razlika u dužini neurita između neurona uzgojenih na staklu i MPS-u. Dužina neurita analizirana je samo nakon 1 DIV i 3 DIV, budući da je mjerenje dužine neurita nakon 7 DIV bilo nemoguće zbog vrlo dugih i isprepletenih neurita koji su se protezali izvan vidnog polja.

Broj neurita po neuronu bio je značajno niži nakon 1 DIV kod neonatalnih neurona smještenim u 3. okomitom odjeljku u usporedbi s drugim okomitim odjeljcima i kontrolnim staklenim podlogama (jednosmjerna ANOVA, glavni učinak $F(3,76) = 2.846$; $P = 0.0431$). Nakon 3 DIV, broj neurita smanjio se u svim okomitim odjeljcima u usporedbi s onima uzgojenim na staklu (jednosmjerna ANOVA, glavni učinak $F(3,70) = 3.090$; $P = 0.0326$) (Slika 10b). Sličan obrazac uočen je i kod adultnih neuronima (Slika 10d). Nakon 1 DIV, broj neurita po neuronu u 2. i 3. okomitom odjeljku bio je manji od onih uzgojenih na staklenim površinama, kao i broj neurita u 1. i 2. okomitom odjeljku nakon 3 DIV (jednosmjerna ANOVA, glavni učinak $F(3,84) = 9.080$; $P < 0.0001$)

Ovi rezultati sugeriraju da specifične topografije MPS uzgojnih podloga pružaju povoljno okruženje za rast neonatalnih i adultnih neurona s manjim brojem dužih neurita, posebno u područjima s razmakom između mikro-igličastih struktura između 0.6 i 3.2 μm (1. i 2. okomiti odjeljak).



Slika 10. Učinci površinske topografije mikro-igličastih podloga (MPS), odnosno razmaka između mikro-igličastih struktura na (a, c) prosječnu dužinu neurita i (b, d) broj neurita, nakon 1. i 3. dana *in vitro* (DIV), (a, b) neonatalnih i (c, d) adultnih neurona. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SEM. Statistički značajne razlike između kontrolnih staklenih i MPS podloga označene su zvjezdicom (jednosmjerna ANOVA, Bonferronijev post-hoc test, p-vrijednosti navedene u tekstu). Za (a, b) analizirana su ukupno 194 neonatalna neurona: staklo 1 DIV (n = 31), staklo 3 DIV (n = 31); MPS odjeljci: 1. okomiti 1 DIV (n = 23), 1. okomiti 3 DIV (n = 27); 2. okomiti 1 DIV (n = 26), 2. okomiti 3 DIV (n = 21), 3. okomiti 1 DIV (n = 19), 3. okomiti 3 DIV (n = 16). Za (c, d) analizirano je ukupno 189 adultnih neurona: staklo 1 DIV (n = 34), staklo 3 DIV (n = 30); MPS odjeljci: 1. okomiti 1 DIV (n = 20), 1. okomiti 3 DIV (n = 29); 2. okomiti 1 DIV (n = 23), 2. okomiti 3 DIV (n = 21), 3. okomiti 1 DIV (n = 15), 3. okomiti 3 DIV (n = 17).

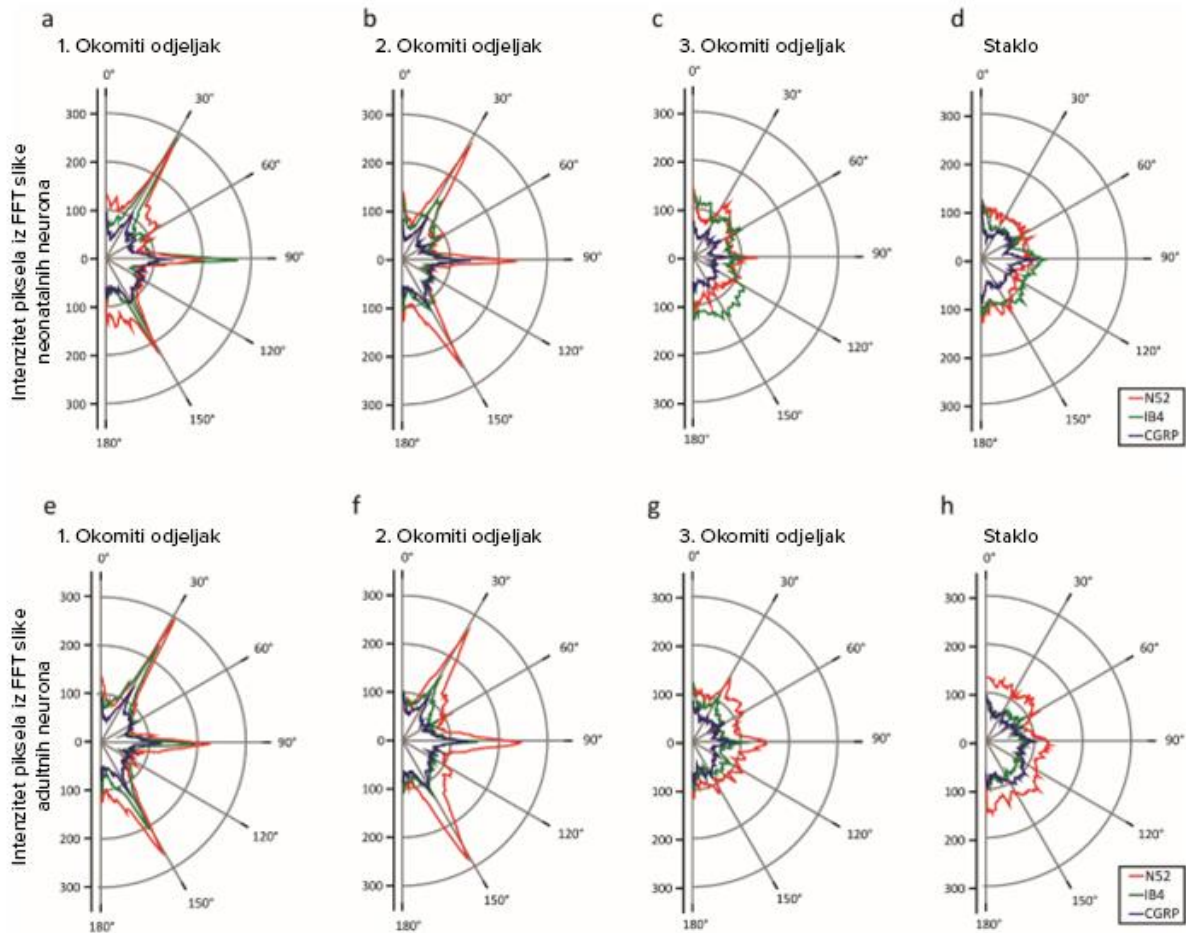
4.1.3. Usmjerenost neurita na mikro-igličastim uzgojnim podlogama

Uz analizu dužine i broja neurita, procijenjena je i usmjerenost neurita neonatalnih i adultnih neurona spinalnog ganglija, kako bi se istražilo utječe li topografija mikro-igličastih podloga i na taj aspekt morfologije. Neonatalni i adultni neuroni uzgojeni na MPS podlogama i kontrolnom staklu obojeni su glavnim markerima različitih podtipova neurona spinalnog ganglija (N52, CGRP i IB4), a imunofluorescentne slike (ukupno $n = 180$ s neonatalnim i $n = 180$ s adultnim neuronima) analizirane su korištenjem FFT algoritma softvera ImageJ. Ova je morfometrijska analiza proširena na podtipove neurona spinalnog ganglija s obzirom da dobiveni podaci daju informacije o usmjeravanju rasta neurita u željenom smjeru što je veoma važno u raznim biomedicinskim primjenama, uključujući razvoj neuralnih implantata u tkivnom inženjerstvu ili za elektrofiziološka snimanja koristeći tehnologiju mikro-elektrodnih čipova.

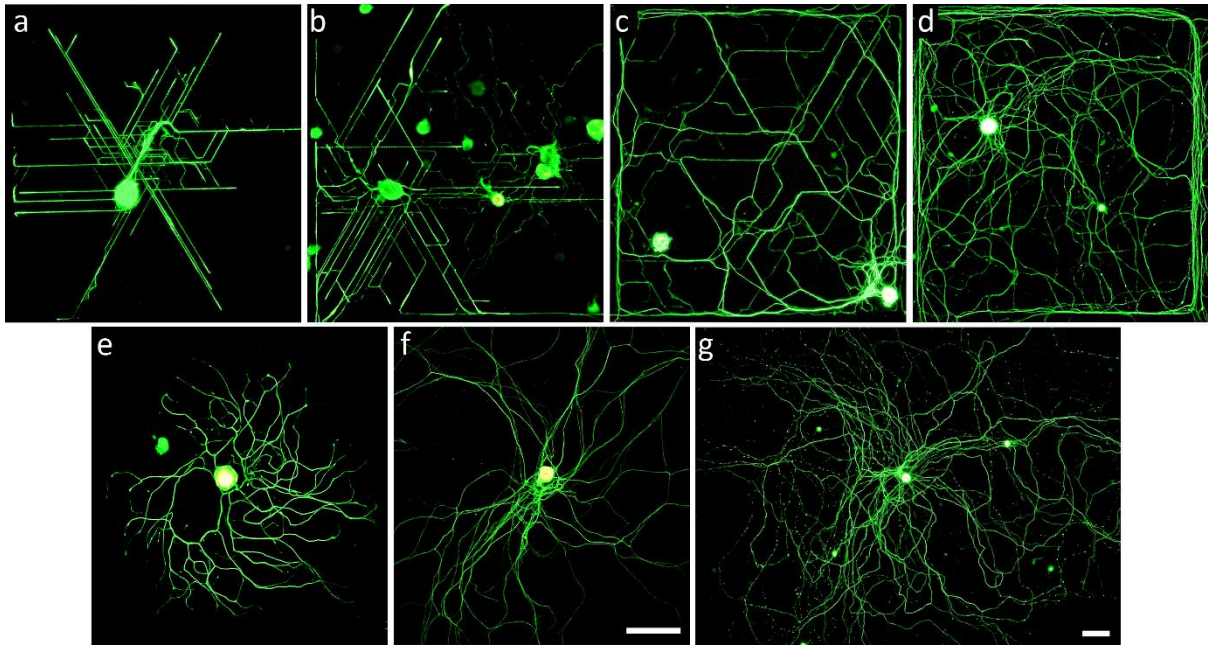
FFT analiza pokazala je da na smjer i orijentaciju rasta neurita snažno utječe topografija mikro-igličastih površina, u smislu razmaka između mikro-igličastih struktura (Slika 11, 12). Najveći utjecaj topografije MPS-a uočen je u područjima 1. okomitog odjeljka s rasponom razmaka između struktura od $0.6-1.4 \mu\text{m}$ (Slika 11 a, e) te 2. okomitog odjeljka s rasponom razmaka između struktura od $1.6-3.2 \mu\text{m}$ (Slika 11 b, f). U tim regijama, N52-, IB4- i CGRP-pozitivni neuriti slijedili su heksagonalne uzorke mikro-igličastih struktura, usmjeravajući se duž tri osi pod kutovima od 30, 90 i 150 stupnjeva. Ovakav usmjeren rast neurita primijećen je u svim podtipovima neurona spinalnog ganglija, i adultnih i neonatalnih. Suprotno tome, topografija MPS-a u područjima 3. okomitog odjeljka s rasponom razmaka između struktura od $4-15 \mu\text{m}$ (Slika 11 c, g) nije izazvala preferencijalni rast neurita ni u kojem smjeru i bila je slična nasumično orijentiranom rastu opaženom na kontrolnim staklenim podlogama (Slika 11 d, h).

Primjeri imunofluorescentno obojenih neonatalnih i adultnih neurona spinalnog ganglija pokazuju postojanje topografskog usmjeravanja u 1. i 2. okomitim odjeljcima MPS podloga (Slika 12 a-c) te njegovo smanjenje prema 3. okomitom odjeljku (Slika 12 d). Jasno je vidljivo da ravne kontrolne staklene površine nemaju sposobnost topografskog usmjeravanja, s nasumično orijentiranim neuritima (Slika 12 e-g). Ovi podaci pokazuju da samo specifičan raspored mikro-igličastih struktura daje topografske smjernice za rast neurita neonatalnih i adultnih neurona spinalnog ganglija. Postojanje specifičnog usmjerenja neurita u MPS

područjima s uskim razmakom između struktura (1. i 2. okomiti odjeljci) može se djelomično objasniti dostupnošću i blizinom struktura što je potvrđeno analizom SEM slika (Slika 9).



Slika 11. Kvantitativni učinci površinske topografije mikro-igličastih podloga (MPS), odnosno razmaka između mikro-igličastih struktura, na usmjerenost neurita u različitim podtipovima (N52, IB4 i CGRP markeri): (a-d) neonatalnih i (e-h) adultnih neurona spinalnog ganglija. Radijalne vrijednosti predstavljaju intenzitet fluorescencije piksela iz FFT slika duž istog kuta. Kutovi su prikazani od 0° do 180°, budući da je FFT osno simetrična. Analiziran je ukupan broj od 180 neonatalnih i 180 adultnih neurona (n = 60 po svakom staničnom markeru).



Slika 12. Učinak površinske topografije mikro-igličastih uzgojnih podloga (MPS) na usmjerenost neurita kultiviranih neurona spinalnog ganglija. Reprezentativne imunofluorescentne slike N52-označenih neurita: (a) adultnih i (b) neonatalnih neurona uzgojenih u 1. okomitom odjeljku MPS-a nakon 1. dana *in vitro* (DIV), (c) adultnih neurona uzgojenih u 2. okomitom odjeljku nakon 3 DIV, (d) adultnih neurona uzgojenih u 3. okomitom odjeljku nakon 7 DIV, te adultnih neurona uzgojenih na kontrolnoj staklenoj površini nakon (e) 1 DIV, (f) 3 DIV i (g) 7 DIV. Mjerna traka: (a-f) 200 μm i (g) 100 μm .

4.2. Rezultati elektrofiziološke analize neurona

Cilj naše druge studije bio je istražiti elektrofiziološka svojstva neurona spinalnog ganglija, uključujući parametre akcijskih potencijala te učestalost okidanja akcijskih potencijala neurona spinalnog ganglija, uzgojenih *in vitro* na silicijskim mikro-igličastim podlogama u usporedbi s kontrolnim staklenim ravnim podlogama, koristeći prilagođenu patch-clamp tehniku snimanja cijele stanice (engl. *whole-cell patch-clamp*).

4.2.1. Princip prilagođenog patch-clamp sustava

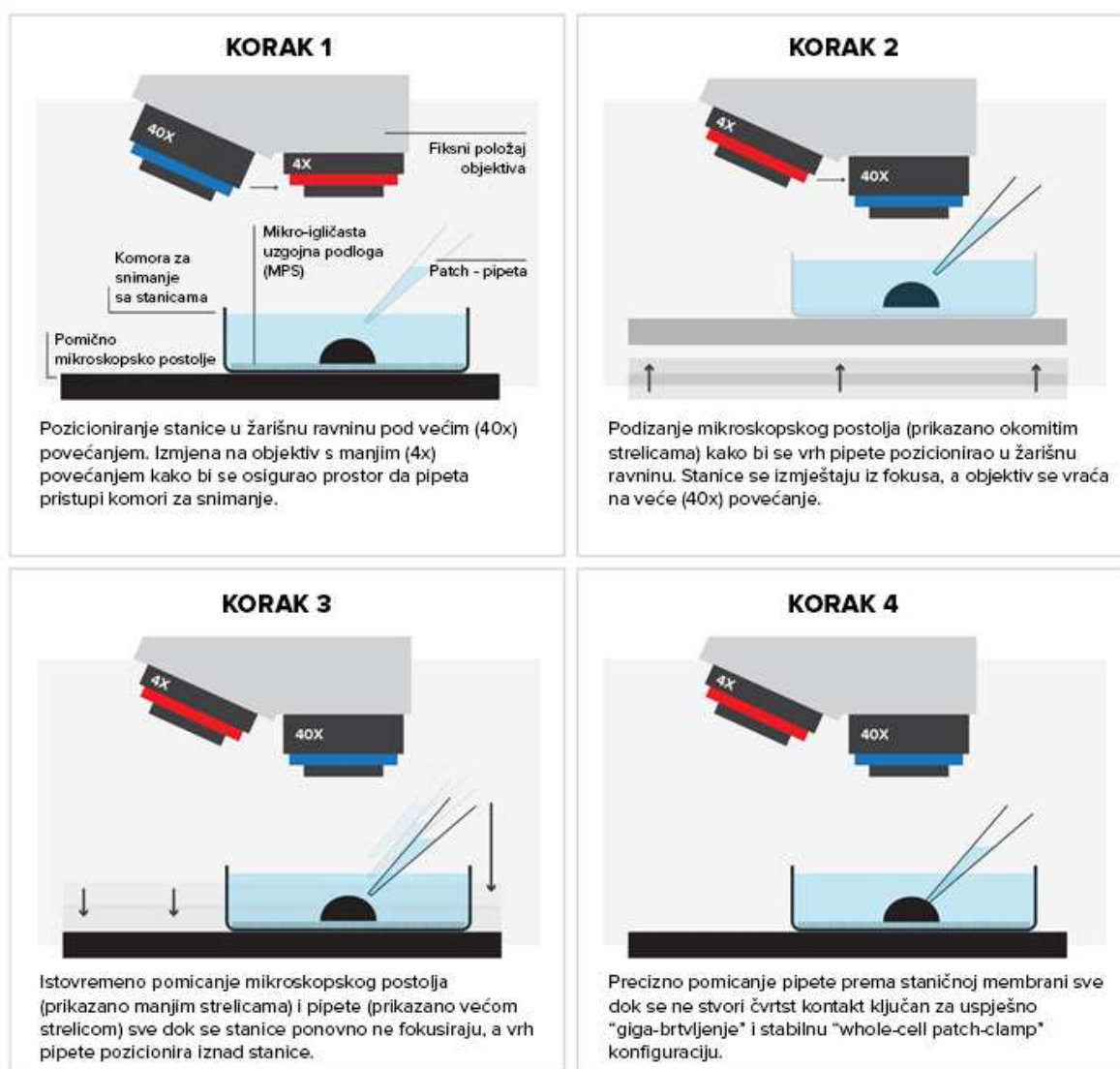
U svrhu istraživanja, razvijen je prilagođeni patch-clamp sustav temeljen na uspravnom (engl. *upright*) mikroskopu, osmišljen kako bi se prevladala neprozirnost mikro-igličastih podloga. Konvencionalni patch-clamp sustavi, koji se oslanjaju na invertne mikroskope, optimalni su za rad s prozirnim supstratima poput staklenih ili plastičnih uzgojnih podloga, ali ne zadovoljavaju potrebe kada su u pitanju neprozirni materijali.

Ovaj se prilagođeni sustav sastoji od uspravnog mikroskopa s fiksnim položajem objektiva i mikroskopskog postolja pomičnog po x-, y- i z-osi za precizno podešavanje žarišne ravnine stanice, te patch-clamp sustava u kojem se žarišna ravnina pipete kontrolira pomoću mikromanipulatora. Međutim, u takvoj konfiguraciji pristup pipete stanici te postizanje okomitog kuta između pipete i stanične membrane, ključnog za formiranje pouzdanog „giga-brtvljenja“, odnosno brtvljenja s otporom većim od 1 G Ω (engl. *giga-ohm seal*) (116), predstavlja izazov zbog ograničenog slobodnog prostora iznad uzorka, s obzirom da su objektiv pozicionirani iznad mikroskopskog postolja. Kako bi se to prevladalo, korišten je ne-imerzijski objektiv velike radne udaljenosti (engl. *non-immersion long-working distance objective*). Ova modifikacija omogućila je da se mikroskopsko postolje, zajedno sa stanicama, pozicionira na odgovarajućoj udaljenosti od objektiva. Takav raspored pruža dovoljno prostora za okomiti pristup pipete staničnoj membrani, rezultirajući visokim stopama uspjeha za uspostavu „giga-brtvljenja“. Ovim pristupom, efektivno su replicirani uvjeti tradicionalnih patch-clamp sustava s invertnim mikroskopom, gdje zbog objektiva smještenih ispod mikroskopskog postolja postoji dovoljno slobodnog prostora za manevriranje pipetom iznad uzorka.

U ovoj prilagođenoj konfiguraciji, proces patch-clamp snimanja cijele stanice (engl. *whole-cell patch-clamp*) ilustriran je na Slici 13. Prvo, pod većim povećanjem (objektiv 40x) identificira se stanica prikladna za snimanje, te se postavlja u žarišnu ravninu podešavanjem z-osi mikroskopskog postolja. Zatim se stavlja objektiv s manjim povećanjem (objektiv 4x) kako bi se osigurao dodatan prostor da pipeta pristupi komori za snimanje sa stanicama, čime se umanjuje rizik oštećenja vrha pipete (korak 1). Nakon toga, vrh pipete se pozicionira u žarišnu ravninu i približava površini mikro-igličaste podloge sa stanicama podizanjem mikroskopskog postolja. Stanice su sada izmještene iz fokusa, a objektiv se vraća na veće (40x) povećanje (korak 2). U sljedećem koraku, postolje mikroskopa i pipeta istovremeno se pomiču kako bi se stanice ponovno fokusirale, a vrh pipete približio staničnoj membrani. Naime, okretanjem mikro vijka u smjeru kazaljke na satu, postolje mikroskopa se spušta, izbacujući pipetu iz fokusa, a zatim se pipeta spušta prema dolje pomoću mikromanipulatora kako bi se ponovno fokusirala. Ovaj se korak ponavlja sve dok stanice nisu ponovno fokusirane, a vrh pipete precizno pozicioniran iznad ciljane stanice (korak 3). Tijekom ovog koraka treba biti oprezan kako bi se eliminirao rizik od lomljenja vrha pipete o dno komore za snimanje i oštećenje stanice. Naposljetku, pipeta se precizno pomiče prema stanici sve dok se ne stvori čvrst kontakt između pipete i stanične membrane, ključan za uspješno „giga-brtvljenje“ i stabilno snimanje stanice putem patch-clamp tehnike (korak 4).

U ovoj prilagođenoj konfiguraciji, pozicioniranje žarišne ravnine stanice ostvaruje se pomicanjem z-osi mikroskopskog postolja. To predstavlja značajnu razliku u odnosu na konvencionalni patch-clamp sustav s invertnom orijentacijom objektiva, pri čemu postolje mikroskopa ostaje nepomično dok se podešavanje žarišne ravnine oslanja na pomicanje objektiva po z-osi. Također, u usporedbi s konvencionalnim sustavom s uspravnom orijentacijom objektiva, u ovom istraživanju korišten je objektiv s velikom radnom udaljenošću kako bi se omogućilo manevriranje pipetom te postigla stabilna patch-clamp konfiguracija cijele stanice. Kao rezultat toga, naš prilagođeni pristup pokazao je stabilnost i dobre performanse. Preciznom i sinergističkom koordinacijom pokreta između postolja mikroskopa i pipete, žarišne ravnine stanice i pipete usklađene su u jednu žarišnu ravninu detekcije, što je omogućilo izvođenje patch-clamp eksperimenata. Dodatno, korištenje objektiva velike snage s produženom radnom udaljenošću (preko 10 mm), uvelike poboljšava vizualizaciju uzorka, a također jamči dovoljno slobodnog prostora iznad uzorka da pipeta okomito priđe staničnoj membrani, što rezultira stvaranjem pouzdanog „giga brtvljenja“ i produljenjem ukupnog

procesa snimanja. Kako bi se dobio bolji kontrast slike, korišteno je svjetlosno polje s Hoffmanovom modulacijom.



Slika 13. Shematski prikaz postupka patch-clamp snimanja cijele stanice *in vitro* (engl. *whole-cell patch-clamp*) korištenjem prilagođenog eksperimentalnog sustava koji se sastoji od uspravnog mikroskopa s fiksnim objektivima i pomičnim mikroskopskim postoljem (po x-, y- i z-osi) na kojem se nalazi komora za snimanje sa stanicama, te sustava za patch-clamp (pipeta, držač pipete, mikromanipulator, pojačalo, softver, itd.). Žarišna ravnina stanice podešava se pomoću mikroskopskog postolja, dok se žarišna ravnina pipete kontrolira pomoću mikromanipulatora. Kombinacijom pomicanja pipete i mikroskopskog postolja po z-osi, optičke ravnine stanice i pipete poravnavaju se u jednu detekcijsku žarišnu ravninu, osiguravajući precizna i pouzdana elektrofiziološka mjerenja.

4.2.2. Elektrofiziološka svojstva neurona spinalnog ganglija na MPS podlogama

Primarni cilj ove studije bio je procijeniti utjecaj silicijskih mikro-igličastih uzgojnih podloga (MPS) na elektrofiziološka svojstva disociranih neurona spinalnog ganglija *in vitro*. Konkretno, cilj nam je bio procijeniti učinak MPS površina na intrinzična električna svojstva neurona (npr. membranski potencijal u mirovanju), na svojstva akcijskih potencijala (npr. amplituda AP-a) te na sposobnost okidanja akcijskih potencijala, pružajući tako ključan uvid u funkcionalnu stabilnost neurona.

Kako bi se prikupili potrebni podaci, provedeno je patch-clamp snimanje cijele stanice (engl. *whole-cell patch-clamp*) u načinu rada "current-clamp" u tri faze. Prva faza uključivala je snimanje potencijala mirovanja bez primijenjene struje, druga faza uključivala je primjenu niza depolarizirajućih struja kako bi se pomaknuo membranski potencijal i izazvao AP, dok je u trećoj fazi primijenjena struja ponovno vraćena na nulu.

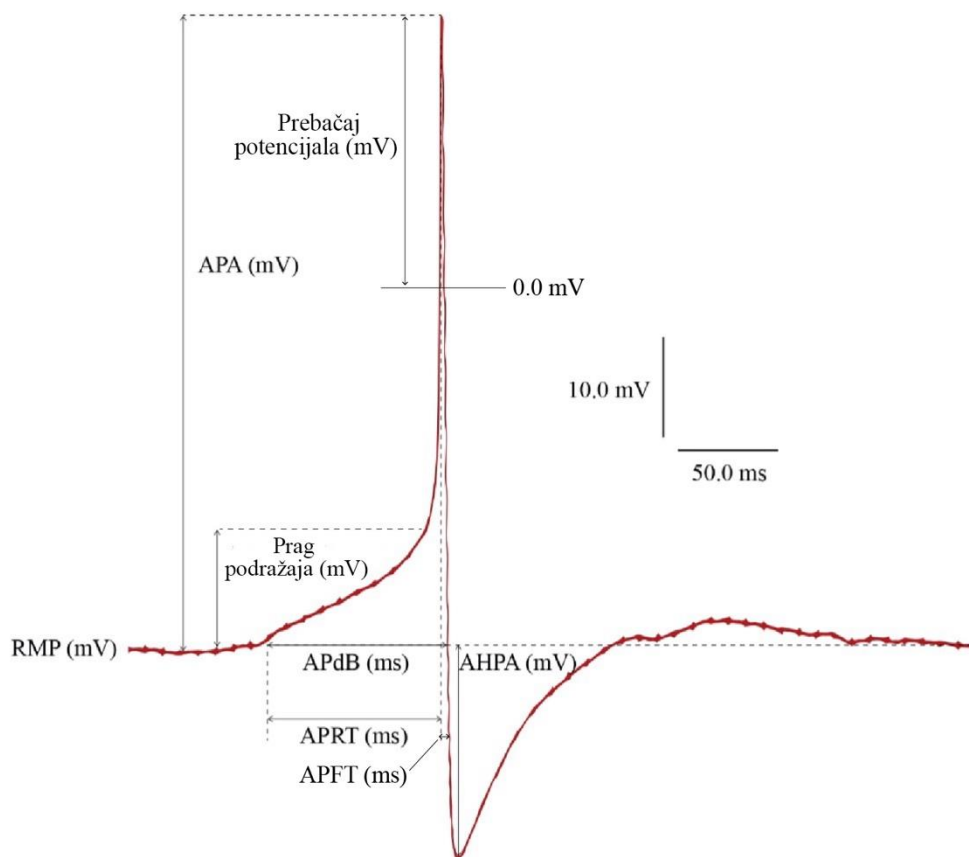
Elektrofiziološki parametri, prikazani na Slici 14, dobiveni su kraćom (100 ms) primjenom struje u rasponu od 50 pA do 1 nA u koracima od 50 pA kako bi se minimizirao utjecaj primijenjene struje na akcijske potencijale. Zabilježen je transmembranski napon iz pet različitih stanica za svaku podlogu – kontrolne staklene i silicijske MPS podloge – te su analizirani karakteristični elektrofiziološki parametri prikazani na Slici 15. Vizualni pregled grafikona ukazuje da su svi parametri unutar sličnog raspona neovisno o uzgojnoj podlozi.

Kako bismo to potvrdili, proveli smo Mann-Whitneyev test za svaki par podataka kako bismo procijenili statistički značajna odstupanja. Rezultati su pokazali da nema značajnih odstupanja u elektrofiziološkim svojstvima između dviju vrsta uzgojnih podloga. Konkretno, nije bilo značajnih razlika u prosječnim membranskim potencijalima mirovanja (engl. *resting membrane potentials, RMP*) neurona uzgojenih na MPS površinama (-34.6 ± 1.0 mV) u usporedbi s kontrolnim staklom (-37.8 ± 3.6 mV). Slično, nisu primijećene značajne promjene u drugim elektrofiziološkim parametrima, uključujući prag podražaja AP-a (engl. *threshold*) (-15.6 ± 2.6 mV na staklu vs. na -14.23 ± 1.6 mV na MPS-u), amplitudu AP-a (64.2 ± 3.2 mV na staklu vs. 63.5 ± 4.1 mV na MPS-u), prebačaj potencijala (engl. *overshoot*) (26.3 ± 1.3 mV na staklu vs. 28.9 ± 3.3 mV na MPS-u), trajanje AP-a (engl. *AP duration at the base*) (80.8 ± 8.7 ms na staklu u odnosu na 84.5 ± 11.7 ms na MPS-u), vrijeme porasta AP-a (engl. *AP rising time*) (73.5 ± 7.3 ms na staklu u odnosu na 80.2 ± 10.9 ms na MPS-u), vrijeme pada AP-a (engl.

AP falling time) (7.2 ± 3.6 ms na staklu u odnosu na 4.2 ± 1.5 ms na MPS-u), i amplituda naknadne hiperpolarizacije (engl. *afterhyperpolarization amplitude*) (-14.0 ± 1.1 mV na staklu u odnosu na -16.2 ± 4.5 mV na MPS-u). Također, statistička analiza nije pokazala značajne razlike u membranskoj kapacitivnosti (engl. *cell / membrane capacitance*) između neurona uzgojenih na MPS površinama (13.7 ± 1.2 pF) i onih na kontrolnom staklu (14.5 ± 0.4 pF) (P vrijednost 0.8413). Reprezentativni akcijski potencijali dobiveni kraćim ubrizgavanjem struje, te specifično korišteni za analizu elektrofizioloških parametara prikazani su na Slici 16 (A-B).

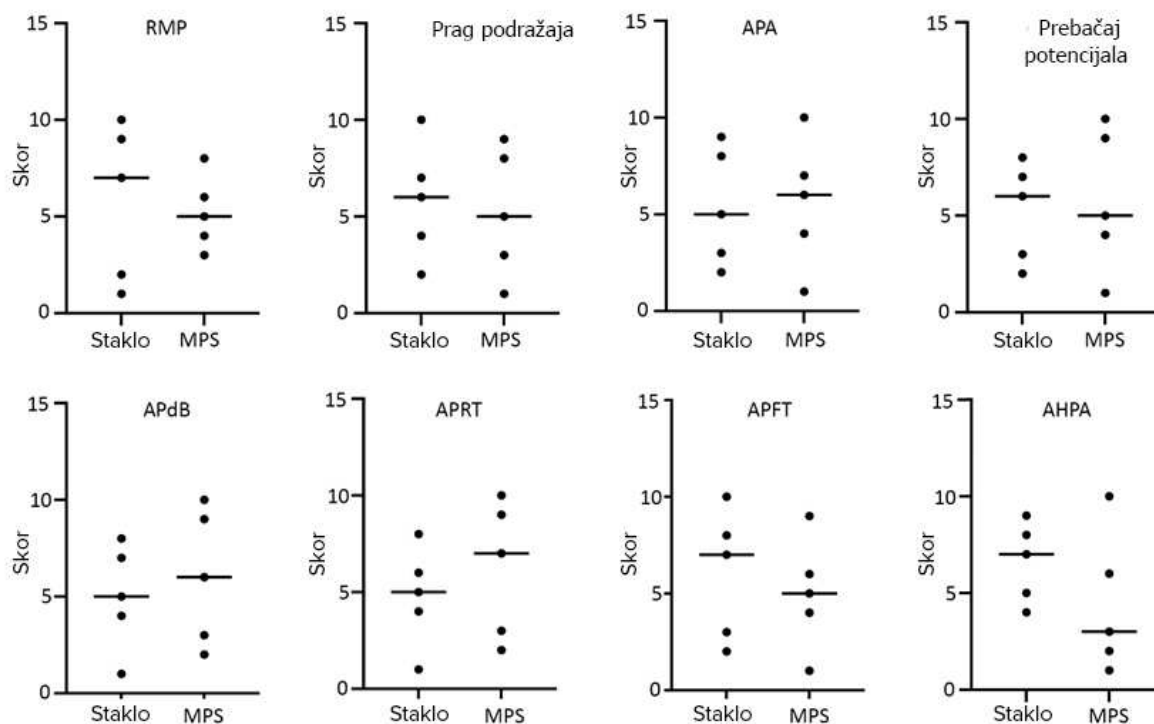
Nadalje, procijenili smo sposobnost generiranja akcijskih potencijala u neuronima kultiviranim na MPS-u i staklenim podlogama kako bismo usporedili njihovu sposobnost obrade neuronskih informacija, što je ključan pokazatelj pravilne stanične funkcije. Zabilježen je broj akcijskih potencijala generiranih kao odgovor na duže (500 ms) impulse struje u rasponu od 10 pA i 200 pA u koracima od 10 pA. Primijećeno je da neuroni spinalnog ganglija generiraju jednostruke (Slika 16, C-D) i višestruke (dva do pet) akcijske potencijale (Slika 16, E-F) na oba tipa uzgojnih podloga, MPS-u i staklu, s amplitudama u rasponu od 55 mV do 75 mV. Time rezultati ponovno naglašavaju odsutnost bilo kakvog značajnog utjecaja sastava podloge na elektrofiziološka svojstva neurona spinalnog ganglija. Također, nismo uočili nikakve promjene u elektrofiziološkim aspektima neurona u različitim područjima mikro-igličastih podlogama (podaci nisu prikazani), što dodatno podupire zaključak da dimenzije i gustoća mikro-igličastih struktura u našoj studiji nemaju štetan utjecaj na homeostazu i funkciju neurona.

Zaključno, svi podaci zajedno ukazuju na to da upotreba 3D silicijskih mikro-igličastih podloga *in vitro* nema značajan negativan utjecaj na elektrofiziološka svojstva disociranih neurona spinalnog ganglija u usporedbi s kontrolnim staklenim površinama, čime se ističe potencijal MPS podloga kao vrijedne platforme za stanične studije bez ugrožavanja funkcije neurona.

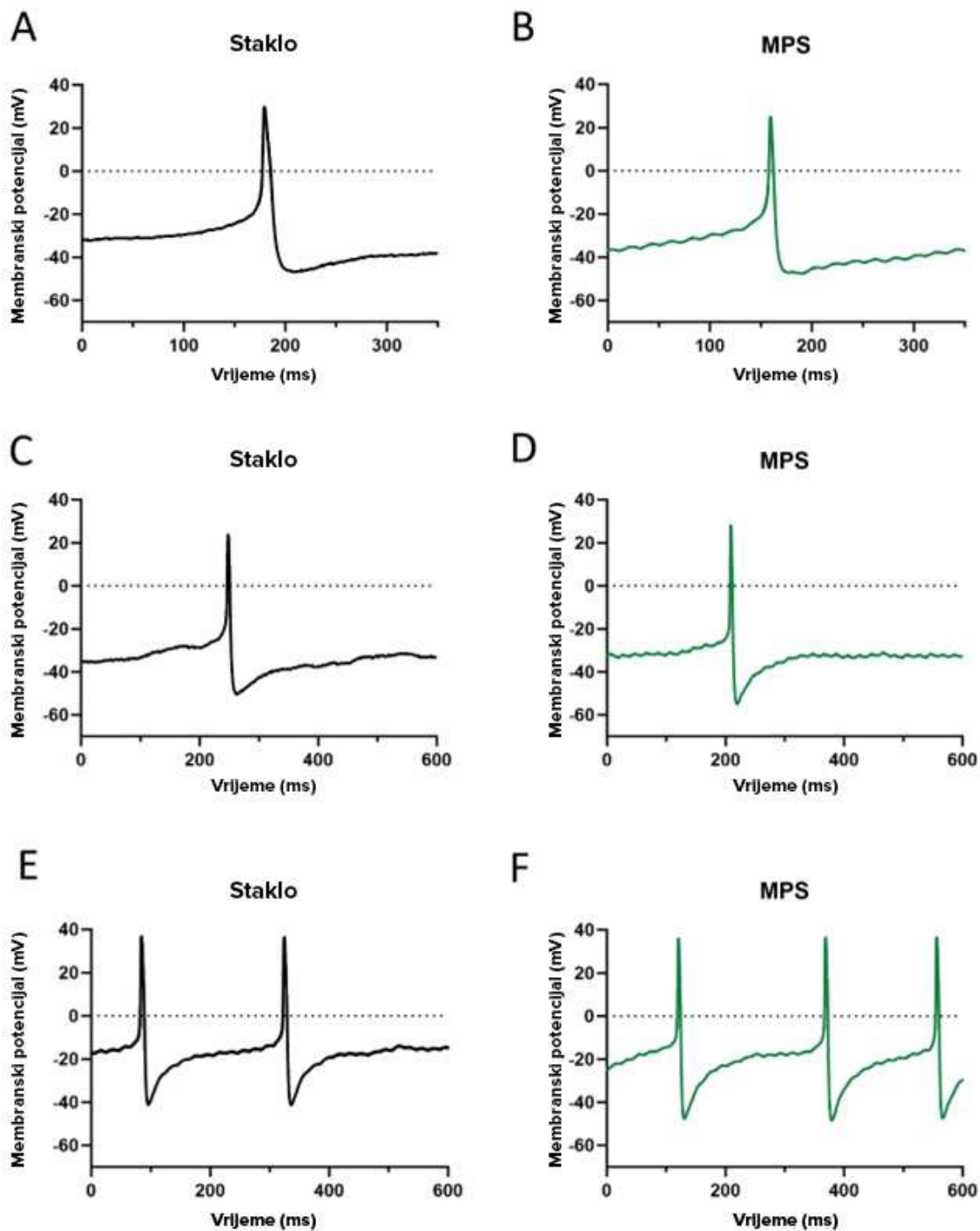


Slika 14. Valni oblik akcijskog potencijala (AP) koji prikazuje izmjerene elektrofiziološke parametre. Membranski potencijal mirovanja (engl. *resting membrane potential*, *RMP*) definiran je kao razlika napona na staničnoj membrani u stanju mirovanja. Prag podražaja AP-a (engl. *threshold*) identificira se kao napon u trenutku početka AP-a, dok se amplituda AP-a (*APA*) izračunava kao razlika između membranskog potencijala mirovanja i maksimalnog napona AP-a, poznatog kao vrhunac AP-a (engl. *AP peak*). Prebačaj potencijala (engl. *overshoot*) određuje se od 0 mV do vrhunca AP-a. Trajanje AP-a (engl. *AP duration at the base*, *APdB*) definira se kao ukupno trajanje AP-a prije faze hiperpolarizacije, te obuhvaća vrijeme porasta AP-a (engl. *AP rising time*, *APRT*) odnosno vrijeme potrebno da se postigne vrhunac AP-a i vrijeme pada AP-a (engl. *AP falling time*, *APFT*) odnosno vrijeme potrebno da se AP vrati na svoj mirovni potencijal nakon što dostigne svoj vrhunac. Amplituda naknadne hiperpolarizacije (engl. *afterhyperpolarization amplitude*, *AHP*) mjeri se od potencijala mirovanja do najviše hiperpolarizirane razine tijekom AHP faze. **Kratice:** membranski potencijal mirovanja (*RMP*), amplituda akcijskog potencijala (*APA*), ukupno trajanje

akcijskog potencijala (APdB), vrijeme porasta akcijskog potencijala (APRT), vrijeme pada akcijskog potencijala (APFT) i amplituda naknadne hiperpolarizacije (AHPA); mV – milivolti; ms – milisekunde.



Slika 15. Pregled karakterističnih elektrofizioloških parametara neurona spinalnog ganglija (DRG) na mikro-igličastim silicijskim uzgojnim podlogama (MPS) i ravnim staklenim površinama. Nije uočena statistički značajna razlika između parametara akcijskih potencijala zabilježenih u neuronima uzgojenim na staklu i MPS-u (Mann-Whitneyev test: y-os prikazuje „Skor“ ili „Rang vrijednosti podataka“ (engl. *Score / Rank values of data points*) s obzirom da se prilikom izvođenja ovog statističkog testa sve vrijednosti rangiraju od nižih prema višima u obje skupine, te izračunava i uspoređuje prosjek rangova (prikazan horizontalnom linijom) u svakoj skupini). Broj neurona snimljenih na svakoj vrsti podloge: n = 5. **Kratice:** membranski potencijal mirovanja (RMP), amplituda akcijskog potencijala (APA), ukupno trajanje akcijskog potencijala (APdB), vrijeme porasta akcijskog potencijala (APRT), vrijeme pada akcijskog potencijala (APFT) i amplituda naknadne hiperpolarizacije (AHPA).



Slika 16. Reprezentativni akcijski potencijali (AP) snimljeni patch-clamp tehnikom (engl. *whole-cell patch-clamp*) u načinu rada “current-clamp” od neurona spinalnog ganglija (DRG) kultiviranih na silicijskim mikro-igličastim podlogama (MPS) i kontrolnim staklenim površinama. A-B: AP kao odgovor na kraće (100 ms) injekcije struje. C-F: AP kao odgovor na duže (500 ms) impulse struje. Neuron spinalnog ganglija generirali su pojedinačne (A-D) i višestruke (dva do pet) akcijske potencijale (E, F) na oba tipa uzgojnih podloga, MPS i staklu. Isprekidane vodoravne linije označavaju 0 mV.

5. RASPRAVA

Ova doktorska disertacija obuhvaća dvije studije koje je ispituju utjecaj topografski modificiranih trodimenzionalnih uzgojnih podloga s mikro-igličastim strukturama (engl. *micro-pillar substrates, MPS*) na ponašanje neurona spinalnog ganglija izoliranih iz štakora. Prva studija fokusirana je na eksperimentalno istraživanje o utjecaju topografije mikro-igličastih podloga na rast i raspodjelu neurona, kao i na njihovu morfologiju, uključujući usmjerenost, duljinu i broj neurita, u usporedbi s kontrolnim ravnim staklenim podlogama. Druga studija predstavlja metodološko istraživanje razvoja patch-clamp tehnike za snimanje na neprozirnim uzgojnim podlogama, što je ujedno i prvi opis takve metodologije. Osim toga, druga studija uključuje i eksperimentalno istraživanje elektrofizioloških svojstava neurona spinalnog ganglija na mikro-igličastim podlogama, uključujući parametre i sposobnost generiranja akcijskih potencijala, u odnosu na kontrolne ravne podloge. Rezultati ovih studija, koje uključuju detaljnu morfološku i elektrofiziološku karakterizaciju neurona na 3D podlogama, predstavljaju temelj za buduća translacijska istraživanja u biomedicini. Cilj je osigurati da takve 3D podloge ne samo da ne narušavaju homeostazu i funkciju neurona, već i da potiču njihov željeni rast, morfologiju i kontrolirano topografsko vođenje, prije njihove široke primjene u različitim biomedicinskim područjima.

5.1. Utjecaj MPS podloga na raspodjelu i morfologiju neurona spinalnog ganglija

Naša prva studija pokazala je da silicijske mikro-igličaste podloge (MPS) mogu učinkovito podržati rast neurona spinalnog ganglija, kako neonatalnih tako i adultnih. Raspodjela neurona na ovim podlogama nije uniformna, za razliku od onih na konvencionalnim ravnim staklenim podlogama, pri čemu neuroni spinalnog ganglija preferiraju područja s određenim topografskim karakteristikama. Štoviše, određene topografske značajke MPS podloga povoljnije utječu na rast neurona u usporedbi s ravnim kontrolnim podlogama. Zanimljivo je da neonatalni i adultni neuroni imaju različite preferencije; neonatalni neuroni favoriziraju područja MPS-a s uskim razmakom između mikro-igličastih struktura (od 0.6 do 1.4 μm ; 1. okomiti odjeljak) neovisno o širini struktura, dok adultni neuroni preferiraju šire strukture (od 1.6 do 2.4 μm ; 2. vodoravni odjeljak) s nešto većim razmakom (od 1.6 do 3.2 μm ; 2. okomiti odjeljak). U područjima MPS podloga s najširim razmakom između struktura (od 4 do 15 μm 3. okomiti odjeljak) uočen je najslabiji rast neurona, i adultnih i neonatalnih.

Otkriveno je da MPS regije s užim razmakom između mikro-igličastih struktura (u 1. i 2. okomitom odjeljku; od 0.6-1.4 μm , te 1.6-3.2 μm) potiču i bolje morfološke karakteristike kod neonatalnih i adultnih neurona, razvijajući manji broj dužih neurita. U ovim regijama, neuriti različitih podtipova neurona spinalnog ganglija pokazali su usmjeren rast duž tri osi, pod kutovima od 30, 90 i 150 stupnjeva, razlikujući se od nasumično orijentiranog rasta na kontrolnim ravnim staklenim podlogama. Skenirajuća elektronska mikroskopija otkrila je da neuriti rastu izravno na vrhovima mikro-igličastih struktura bez dodira s njihovom bazom u područjima 1. i 2. okomitog odjeljka MPS podloga, što ukazuje na uzrok njihovog specifičnog usmjerenja. S povećanjem razmaka između struktura (4-15 μm ; 3. okomiti odjeljak), neuriti počinju djelomično rasti i između mikro-igličastih struktura, zbog čega dolazi do smanjenja učinka topografskog vođenja te smanjene usmjerenosti neurita i usporedivog nasumičnog rasta kao na kontrolnim staklenim podlogama. Ti rezultati potvrđuju da samo određene konfiguracije mikro-igličastih struktura pružaju ključne topografske smjernice za usmjeren rast neurita kod neurona spinalnog ganglija, kako neonatalnih tako i adultnih.

Tek nekoliko studija istraživalo je kako topografije uzgojnih podloga, i to onih s anizotropnim značajkama, utječu na rast neurona spinalnog ganglija i usmjerenost njihovih neurita. Takve topografije, uključujući mikro-udubljenja (engl. *micro-grooved substrates*) (147), nano-žice (engl. *nanowires*) (148), nano-udubljenjima (engl. *nano-patterned grooves*) (88, 149) ili nano-vlaknima (engl. *electrospun nanofibers*) (86) pokazale su sposobnost usmjeravanja rasta neurita na specifične načine, obično inducirajući paralelno usmjeravanje. Ovaj efekt nije bio ograničen samo na neurone spinalnog ganglija; slični rezultati zabilježeni su i kod drugih tipova neurona uzgojenih na anizotropnim površinama, gdje periodične geometrijske karakteristike potiču ne samo veći rast neurita nego i njihovo usmjereno širenje duž preferiranih smjerova (150).

Ova studija prva je koja istražuje utjecaj izotropne topografije na rast i morfologiju neurona spinalnog ganglija, uključujući neonatalne i adultne. Na izotropnim strukturama, neuriti prate postojeće kontakte (stupiće/iglice), te se protežu prema novim kontaktima u blizini, rezultirajući visoko usmjerenim rasporedom neurita (78, 79, 95, 96, 101). U našem slučaju, usmjerenje neurita duž radijalnih kutova od 30°, 90° i 150° bilo je vidljivo samo u regijama s užim razmacima između struktura, što upućuje na to da mikro-igličaste strukture služe kao "točke sidrenja" za rastući konus, omogućujući brže napredovanje. Ovaj fenomen zapažen je i

kod drugih tipova neurona uzgojenih na izotropnim topografijama, sugerirajući univerzalan mehanizam usmjeravanja rasta neurita putem topografskih smjernica (95-97, 99, 113).

Zbog značajnih razlika između neonatalnih i adultnih neurona (38), također možemo očekivati i razlike u njihovim odgovorima na topografiju MPS podloga. Primjerice, niska ekspresija integrina u adultnim neuronima (151) može biti izvor razlika u odnosu na neonatalne neurone. Međutim, naši podaci pokazuju da su te razlike minorne. I neonatalni i adultni neuroni spinalnog ganglija pokazali su poboljšani rast i usmjeravanje neurita u regijama s uskim razmacima između mikro-igličastih struktura (1. i 2. okomiti odjeljci). Ovo povećanje dužine i usmjerenosti neurita, zajedno sa smanjenjem njihovog broja na tim područjima u odnosu na kontrolne staklene podloge, ukazuje na potencijal ovih topografija za podupiranje rasta neurona spinalnog ganglija, bez obzira na njihovu dob ili razvojnu fazu.

Uspoređivanje naših rezultata s drugim studijama predstavlja izazov zbog raznolikosti materijala, veličina, oblika i uniformnosti MPS podloga, kao i različitih metoda korištenih za morfološku analizu neurita. Međutim, rezultati su slični. Uobičajene morfološke promjene koje su zabilježene kod neurona na topografski modificiranim uzgojnim podlogama uključuju usmjeravanje neurita (108, 152), smanjenje grananja neurita (108, 152), povećanje duljine neurita (152-154) i veću polarizaciju (105, 109). Opseg ovih promjena varira ovisno o vrsti neurona i karakteristikama uzgojnih podloga, naglašavajući složenost interakcija između neurona i njihovog fizičkog okruženja.

Mogućnost da se na predvidljiv način *in vitro* regulira ponašanje stanica kroz interakciju s različitim uzgojnim podlogama otvara nove mogućnosti za primjene u tkivnom inženjerstvu, izradi implantata, biosenzorima, mikro-čipovima i osnovnim staničnim istraživanjima. Primjerice, metoda razvijena od strane Poole i suradnika omogućuje izravno praćenje mehanotransdukcije u primarnim osjetnim neuronima na definiranim područjima interakcije stanice i podloge (155). Naš fokus bio je na identificiranju najoptimalnije topografije 3D mikro-igličastih podloga koja favorizira rast i usmjerenje neurita, što bi moglo doprinijeti razvoju naprednih mikro-elektrodnih čipova s točno definiranim fizičkim karakteristikama za precizna elektrofiziološka snimanja.

5.2. Utjecaj MPS podloga na elektrofiziološka svojstva neurona spinalnog ganglija

Prethodna istraživanja otkrila su da varijacije u topografiji mikro-igličastih podloga značajno utječu na različite aspekte ponašanja stanica, uključujući njihov rast, usmjerenost, adheziju i vijabilnost, s promjenjivim efektima ovisno o tipu neurona (96, 97, 99, 144, 156). Postoji mogućnost da svi ovi čimbenici mogu inducirati elektrofiziološke karakteristike različite od onih zabilježenih prilikom tradicionalnog kultiviranja stanica na glatkim staklenim ili plastičnim podlogama. Na primjer, fizički pritisak vrha pipete na staničnu membranu neurona, kada se neuroni nalaze na 'šiljastim' topografskim strukturama, poput struktura okomitih stupića (iglica) MPS podloga, može uzrokovati oštećenje neurona i promjene u njihovim elektrofiziološkim svojstvima. Trenutačni nedostatak elektrofizioloških istraživanja disociranih neurona spinalnog ganglija uzgojenih na MPS površinama *in vitro* naglasili su potrebu za ovom studijom.

Naša druga studija pokazala je da elektrofiziološka svojstva disociranih neurona spinalnog ganglija ostaju nepromijenjena na 3D silicijskim mikro-igličastim podlogama u odnosu na kontrolne ravne staklene površine. Korištenjem „whole-cell patch-clamp“ tehnike, utvrđeno je da neuroni kultivirani na mikro-igličastim podlogama zadržavaju slične parametre akcijskih potencijala i sličnu sposobnost generiranja akcijskih potencijala kao i neuroni na kontrolnim podlogama, što implicira da je funkcionalni integritet uzgojenih neurona na mikro-igličastim podlogama osiguran. Pritom je korišten prilagođeni patch-clamp sustav temeljen na uspravnom mikroskopu kako bi se prevladala neprozirnost MPS površina. Dodatne modifikacije sustava, uključujući upotrebu objektiva velike radne udaljenosti i pomično mikroskopsko postolje, omogućile su pristup membrani neurona pod optimalnim kutom, važnim za uspostavljanje kvalitetnog „giga-seal“-a, osiguravajući tako stabilna i pouzdana elektrofiziološka mjerenja koja repliciraju uvjete konvencionalnog patch-clamp sustava s invertnim mikroskopom. Kao rezultat ovih modifikacija, broj neurona isključenih iz analize zbog neadekvatnih uvjeta prilikom snimanja bio je sličan u obje eksperimentalne skupine. Ovo je ujedno i prvi opis metodologije snimanja na neprozirnim podlogama.

Ova linija istraživanja posebno je važna u razvoju visokokvalitetnih elektrofizioloških uređaja opremljenih 3D elektrodama, koji omogućavaju precizno snimanje i stimulaciju elektrogeneriranih stanica. Također, ovakva istraživanja neophodna su za osiguranje da implantati s ugrađenom 3D topografijom budu u potpunosti kompatibilni s prirodnom funkcijom tkiva prilikom njihove integracije u organizam, što je od iznimne važnosti u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj

medicini. Stoga su temeljite elektrofiziološke analize neurona uzgojenih na 3D podlogama neophodne kako bi se potvrdilo da te podloge podupiru zdrav razvoj neurona, njihovu morfologiju i usmjeren rast neurita, bez negativnog utjecaja na njihovu funkciju.

Elektrofiziološki uređaji sa 3D elektrodama, čija topografija odgovara onoj na 3D uzgojnim podlogama, igraju ključnu ulogu u raznim aspektima unutarstanične i izvanstanične elektrofiziologije. To uključuje neuroelektronička sučelja (157), komplementarne metal-oksidne poluvodičke mikro-elektrodne čipove (CMOS-MEA) (158), te tehnike optičkog snimanja (optogenetika) (159). Sučelja za snimanje i stimulaciju neurona neprestano se razvijaju za upotrebu u neuromodulaciji, simuliranju ljudskog senzornog sustava, te integraciji s tehnologijama umjetne inteligencije za ostvarivanje pamćenja i prepoznavanja (160). Napredak u ovom području omogućuje, primjerice, implantaciju mikro-elektrodnih čipova u somatosenzorni i motorički korteks za upravljanje robotskim protezama kod pacijenata s oštećenjima motoričkih funkcija (161).

U okviru našeg istraživanja, korištenje čipova za izvanstanično snimanje, poput CMOS-MEA, ključno je za razumijevanje kako patološka stanja, poput neuropatske boli, utječu na elektrofiziološka svojstva disociranih neurona spinalnog ganglija. Ovi napredni čipovi omogućavaju detaljno praćenje električne aktivnosti neurona, uključujući širenje akcijskih potencijala duž aksona, čime se pruža uvid u dinamiku signalizacije neurona i istraživanje njihovih filtracijskih svojstva na preciznoj razini (137-139). Integracijom električnih stimulacijskih krugova, CMOS-MEA čipovi omogućuju kontrolu nad aktivnošću neurona, što je od izuzetne važnosti za istraživanje mehanizama promijenjene podražljivosti neurona spinalnog ganglija i stvaranja ektopičnih pražnjenja u stanjima kronične boli, kao i za istraživanje odgovora neurona spinalnog ganglija na nove modalitete liječenja boli, poput električne stimulacije spinalnog ganglija (25). Koristeći mikro-igličaste podloge (MPS) koje repliciraju topografsku strukturu aktivnih elektroda na CMOS-MEA čipovima, naša studija teži optimalnom dizajnu ovih čipova te kontroliranom topografskom vođenju neurita kultiviranih neurona. Ovakav pristup ne samo da omogućava precizno modeliranje interakcija između neurona i elektroda, već i pruža temelje za razvoj inovativnih terapijskih strategija usmjerenih na ublažavanje boli.

Naša studija potvrđuje da neuroni spinalnog ganglija, uzgojeni na trodimenzionalnim silicijskim mikro-igličastim podlogama, zadržavaju svoja elektrofiziološka svojstva na razini

usporedivoj s onom kod neurona uzgojenih na tradicionalnim staklenim ravnim podlogama. Ovi rezultati, zajedno s podacima iz prve studije (156) i literature (162), ističu mikro-igličaste podloge kao obećavajuću 3D platformu za stvaranje kontroliranih staničnih okruženja. Sposobnost ovih podloga da očuvaju ključna svojstva neurona spinalnog ganglija, osobito kada raspored i geometrija struktura (iglica/stupića) odgovaraju onima korištenima u našoj studiji, naglašava njihov potencijal za šire primjene u biomedicinske svrhe.

6. ZAKLJUČAK

Glavni zaključci provedenih istraživanja uključujući eksperimentalno istraživanje prve studije te metodološko i eksperimentalno istraživanje druge studije su sljedeći:

- Silicijske mikro-igličaste podloge (MPS) pozitivno utječu na rast i razvoj neurona spinalnog ganglija, kako neonatalnih tako i adultnih. Štoviše, određene topografske značajke MPS podloga povoljnije utječu na rast neurona nego kontrolne staklene ravne podloge.
- Topografija mikro-igličastih podloga utječe na raspodjelu neurona spinalnog ganglija; raspodjela neurona na MPS podlogama nije ravnomjerna, kao kod kontrolnih podloga. Neonatalni neuroni pokazuju preferencijalan rast na područjima MPS-a s uskim razmakom između mikro-igličastih struktura (od 0.6 do 1.4 μm ; 1. okomiti odjeljak) neovisno o veličini struktura. Adultni neuroni preferiraju šire strukture (od 1.6 do 2.4 μm ; 2. vodoravni odjeljak) s nešto većim razmakom između njih (od 1.6 do 3.2 μm ; 2. okomiti odjeljak).
- Topografija mikro-igličastih podloga ima pozitivan učinak na morfologiju neurona spinalnog ganglija u odnosu na kontrolne staklene podloge. U područjima MPS-a s užim razmakom između struktura (u 1. i 2. okomitom odjeljku; od 0.6-1.4 μm , te 1.6-3.2 μm) neonatalni i adultni neuroni pokazuju bolje morfološke karakteristike, uključujući usmjereniji rast neurita, dulje neurite i manju razgranatost neurita, u usporedbi s ostalim područjima MPS-a i kontrolnim podlogama .
- Elektrofiziološka svojstva neurona spinalnog ganglija ostaju nepromijenjena na silicijskim mikro-igličastim podlogama. Neuroni kultivirani na MPS podlogama posjeduju slične parametre akcijskih potencijala i sličnu sposobnost generiranja akcijskih potencijala kao i neuroni na kontrolnim podlogama, što ukazuje na očuvanje funkcionalnog integriteta neurona uzgojenih na MPS podlogama.
- Razvijen je prilagođeni patch-clamp sustav u svrhu snimanja na neprozirnim MPS površinama koji omogućava stabilna i pouzdana elektrofiziološka mjerenja, usporediva s onima dobivenima konvencionalnim patch-clamp sustavom.

7. SAŽETAK

Na ponašanje kultiviranih staničnih modela, posebice neurona, značajno utječu kemijska i fizička svojstva njihovog mikro-okoliša. Za razliku od tradicionalnih monoslojnih sustava, trodimenzionalne (3D) platforme za uzgoj stanica, koje integriraju mikro- i nano-strukture, poboljšavaju performanse staničnih modela oponašajući arhitekturu bioloških tkiva. Stoga se 3D uzgojne podloge sve više koriste u staničnoj biologiji kako bi se stvorili nosači (engl. *scaffolds*) za široki spektar primjena u neurobiologiji, kardiologiji i bioinženjeringu.

Cilj našeg istraživanja i ove doktorske disertacije bio je ispitati učinke 3D uzgojnih podloga na bazi silicija s topografskim strukturama okomitih stupića (iglica) (engl. *micro-pillar substrates*, MPS) na morfološka i elektrofiziološka svojstva neurona spinalnog ganglija *in vitro*. Proveli smo temeljitu analizu rasta i raspodjele neurona, te njihove morfologije (usmjerenost, grananje i dužina neurita) na različitim topografijama MPS podloga, kao i karakteristika akcijskih potencijala u usporedbi s onima na standardnim staklenim površinama.

Rezultati pokazuju da su MPS podloge podjednako pogodne za rast i adultnih i neonatalnih neurona spinalnog ganglija kao i kontrolne staklene podloge, pri čemu neonatalni neuroni preferiraju područja s najužim razmakom između struktura (0.6-1.4 μm), dok adultni neuroni favoriziraju nešto širi razmak (1.6-3.2 μm). U ovim MPS područjima (0.6-3.2 μm) neuroni spinalnog ganglija imali su i bolje morfološke karakteristike, pri čemu su i adultni i neonatalni neuroni razvili manji broj dužih neurita te specifičan usmjereni rast neurita u svim podtipovima neurona (N52-, IB4- i CGRP-pozitivni) usmjeravajući se duž tri glavne osi (30°, 90° i 150°), što nije bio slučaj u preostalom području MPS-a i kontrolnim staklenim podlogama gdje je rast neurita nasumično orijentiran. To naglašava utjecaj topografije MPS-a na usmjeravanje rasta neurita i oblikovanje ukupne morfologije neurona. Na dalje, elektrofiziološka analiza putem patch-clamp tehnike pokazuje da neuroni na MPS-u održavaju parametre akcijskih potencijala, te sposobnost okidanja akcijskih potencijala slične onima na staklu, osiguravajući očuvanje ključnih elektrofizioloških svojstava neurona spinalnog ganglija na površinama MPS-a.

Ova otkrića ističu potencijal MPS uzgojnih podloga kao optimalnog 3D sustava za primjene u neuroznanosti, utirući put za razvoj implantata tkivnog inženjerstva i naprednih čipova za snimanje neurona, poput mikro-elektrodnih čipova (MEA), s precizno definiranim fizičkim značajkama koje potiču i strukturni integritet i funkcionalnu održivost kultiviranih neurona.

8. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU (SUMMARY)

(Characterization of dorsal root ganglion neurons cultured on micro-pillar substrates)

Cultured cellular models, especially neurons, are profoundly influenced by their microenvironment's chemical and physical properties. Unlike traditional monolayer culture systems, three-dimensional (3D) cell culture platforms, integrating micro- and nanostructures, enhance cellular model performance by mimicking biological tissues architecture, leading to their increased use in cell biology to create scaffolds for a broad spectrum of applications across neurobiology, cardiology, and bioengineering.

Our research explores the effects of silicon-based substrates with vertically aligned micro-pillar structures (MPS) on both the morphological and electrophysiological properties of dorsal root ganglion (DRG) neurons *in vitro*. We conducted a thorough analysis of neuronal growth and distribution, morphology (neurite alignment, branching, and length) across different MPS topographies, as well as action potential characteristics compared to those on control glass.

The results indicate that MPS environments are as conducive to the growth of both adult and neonatal DRG neurons as traditional glass surfaces, with neonatal neurons preferring areas with the narrowest spacing between micro-pillar structures (0.6-1.4 μm), and adult neurons favoring a slightly wider spacing (1.6-3.2 μm). In these MPS areas (0.6-3.2 μm) both neonatal and adult DRG neurons had better morphological characteristics, exhibiting smaller number of longer neurites and directed growth of neurites in all subtypes of DRG neurons (N52-, IB4-, and CGRP-positive) aligning along three major axes (30°, 90°, and 150°), which is not the case in the remaining areas of MPS and control glass where neurite growth is randomly oriented. This highlights the influence of MPS topography on directing neurite outgrowth and shaping the overall morphology of DRG neurons. Moreover, electrophysiological analysis via whole-cell patch-clamp recordings indicates that neurons on MPS maintain action potential parameters and firing patterns similar to those on glass, ensuring the preservation of DRG neurons' crucial electrophysiological properties on MPS surfaces.

These findings underscore the potential of MPS as an optimal 3D system for neuroscience, facilitating the development of tissue-engineered constructs and advanced neuro-electronic interfaces, including high-throughput micro-electrode arrays (MEA), with precise physical features that foster both the structural integrity and functional viability of cultured neurons.

9. POPIS LITERATURE

1. Hogan QH. Labat lecture: the primary sensory neuron: where it is, what it does, and why it matters. *Regional anesthesia and pain medicine*. 2010;35(3):306-11.
2. Kandel ER, Jessell TM, Kandel ER, Koester JD, Mack SH, Siegelbaum SA, Vlebooks. *Principles of Neural Science*. 6th edition. ed. New York, N.Y: McGraw-Hill Education LLC; 2021.
3. Abram SE, Yi J, Fuchs A, Hogan QH. Permeability of injured and intact peripheral nerves and dorsal root ganglia. *Anesthesiology*. 2006;105(1):146-53.
4. Jimenez-Andrade JM, Herrera MB, Ghilardi JR, Vardanyan M, Melemedjian OK, Mantyh PW. Vascularization of the dorsal root ganglia and peripheral nerve of the mouse: implications for chemical-induced peripheral sensory neuropathies. *Mol Pain*. 2008;4:10.
5. Pfirrmann CW, Oberholzer PA, Zanetti M, Boos N, Trudell DJ, Resnick D, Hodler J. Selective nerve root blocks for the treatment of sciatica: evaluation of injection site and effectiveness--a study with patients and cadavers. *Radiology*. 2001;221(3):704-11.
6. Sapunar D, Kostic S, Banozic A, Puljak L. Dorsal root ganglion - a potential new therapeutic target for neuropathic pain. *Journal of pain research*. 2012;5:31-8.
7. Krames ES. The role of the dorsal root ganglion in the development of neuropathic pain. *Pain Med*. 2014;15(10):1669-85.
8. Amir R, Michaelis M, Devor M. Burst discharge in primary sensory neurons: triggered by subthreshold oscillations, maintained by depolarizing afterpotentials. *J Neurosci*. 2002;22(3):1187-98.
9. Esposito MF, Malayil R, Hanes M, Deer T. Unique Characteristics of the Dorsal Root Ganglion as a Target for Neuromodulation. *Pain Med*. 2019;20(Suppl 1):S23-S30.
10. Liu CN, Michaelis M, Amir R, Devor M. Spinal nerve injury enhances subthreshold membrane potential oscillations in DRG neurons: relation to neuropathic pain. *J Neurophysiol*. 2000;84(1):205-15.

11. Sapunar D, Ljubkovic M, Lirk P, McCallum JB, Hogan QH. Distinct membrane effects of spinal nerve ligation on injured and adjacent dorsal root ganglion neurons in rats. *Anesthesiology*. 2005;103(2):360-76.
12. Song XJ, Hu SJ, Greenquist KW, Zhang JM, LaMotte RH. Mechanical and thermal hyperalgesia and ectopic neuronal discharge after chronic compression of dorsal root ganglia. *J Neurophysiol*. 1999;82(6):3347-58.
13. Xie WR, Deng H, Li H, Bowen TL, Strong JA, Zhang JM. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. *Neuroscience*. 2006;142(3):809-22.
14. Luscher C, Streit J, Quadroni R, Luscher HR. Action potential propagation through embryonic dorsal root ganglion cells in culture. I. Influence of the cell morphology on propagation properties. *J Neurophysiol*. 1994;72(2):622-33.
15. Stoney SD, Jr. Limitations on impulse conduction at the branch point of afferent axons in frog dorsal root ganglion. *Exp Brain Res*. 1990;80(3):512-24.
16. Sundt D, Gamper N, Jaffe DB. Spike propagation through the dorsal root ganglia in an unmyelinated sensory neuron: a modeling study. *J Neurophysiol*. 2015;114(6):3140-53.
17. Gemes G, Koopmeiners A, Rigaud M, Lirk P, Sapunar D, Bangaru ML, et al. Failure of action potential propagation in sensory neurons: mechanisms and loss of afferent filtering in C-type units after painful nerve injury. *J Physiol*. 2013;591(Pt 4):1111-31.
18. Krames ES. The dorsal root ganglion in chronic pain and as a target for neuromodulation: a review. *Neuromodulation*. 2015;18(1):24-32; discussion
19. Pope JE, Deer TR, Kramer J. A systematic review: current and future directions of dorsal root ganglion therapeutics to treat chronic pain. *Pain Med*. 2013;14(10):1477-96.
20. Vuka I, Vucic K, Repic T, Ferhatovic Hamzic L, Sapunar D, Puljak L. Electrical Stimulation of Dorsal Root Ganglion in the Context of Pain: A Systematic Review of In Vitro and In Vivo Animal Model Studies. *Neuromodulation*. 2018;21(3):213-24.

21. Vuka I, Marcius T, Dosenovic S, Ferhatovic Hamzic L, Vucic K, Sapunar D, Puljak L. Neuromodulation with electrical field stimulation of dorsal root ganglion in various pain syndromes: a systematic review with focus on participant selection. *Journal of pain research*. 2019;12:803-30.
22. Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 1965;150(3699):971-9.
23. Liem L. Stimulation of the Dorsal Root Ganglion. *Prog Neurol Surg*. 2015;29:213-24.
24. Kent AR, Min X, Hogan QH, Kramer JM. Mechanisms of Dorsal Root Ganglion Stimulation in Pain Suppression: A Computational Modeling Analysis. *Neuromodulation*. 2018;21(3):234-46.
25. Koopmeiners AS, Mueller S, Kramer J, Hogan QH. Effect of electrical field stimulation on dorsal root ganglion neuronal function. *Neuromodulation*. 2013;16(4):304-11; discussion 10-1.
26. Lawson SN. The postnatal development of large light and small dark neurons in mouse dorsal root ganglia: a statistical analysis of cell numbers and size. *J Neurocytol*. 1979;8(3):275-94.
27. Lawson SN, Harper AA, Harper EI, Garson JA, Anderton BH. A monoclonal antibody against neurofilament protein specifically labels a subpopulation of rat sensory neurones. *J Comp Neurol*. 1984;228(2):263-72.
28. Perry MJ, Lawson SN, Robertson J. Neurofilament immunoreactivity in populations of rat primary afferent neurons: a quantitative study of phosphorylated and non-phosphorylated subunits. *J Neurocytol*. 1991;20(9):746-58.
29. Dyck PJ, Thomas PK. *Peripheral neuropathy vol 1*. 3rd ed ed. Philadelphia ; London: Saunders; 1993.
30. Harper AA, Lawson SN. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol*. 1985;359:31-46.

31. Lawson SN, Waddell PJ. Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J Physiol.* 1991;435:41-63.
32. Dyck PJ, Thomas PK. *Peripheral neuropathy.* 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2005.
33. Lawson SN. Phenotype and Function of Somatic Primary Afferent Nociceptive Neurones with C-, Adelta- or Aalpha/beta-Fibres. *Exp Physiol.* 2002;87(2):239-44.
34. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.* 2009;139(2):267-84.
35. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001;413(6852):203-10.
36. Djouhri L, Bleazard L, Lawson SN. Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.* 1998;513 (Pt 3)(Pt 3):857-72.
37. Djouhri L, Lawson SN. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004;46(2):131-45.
38. McMahon SB, Koltzenburg M. *Wall and Melzack's textbook of pain : edited by Stephen B. McMahon and Martin Koltzenburg.* 5th ed. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone; 2005.
39. Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, Handwerker H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci.* 1995;15(1 Pt 1):333-41.
40. Scott SA, Scott SA. *Sensory neurons : diversity, development, and plasticity.* New York ; Oxford: Oxford University Press; 1992. xi, 441 p. : ill p.
41. Lawson SN, Crepps B, Perl ER. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and afferent receptive properties of dorsal root ganglion neurones in guinea-pigs. *J Physiol.* 2002;540(Pt 3):989-1002.

42. Lawson SN, McCarthy PW, Prabhakar E. Electrophysiological properties of neurones with CGRP-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglia. *J Comp Neurol.* 1996;365(3):355-66.
43. McCarthy PW, Lawson SN. Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity. *Neuroscience.* 1990;34(3):623-32.
44. Silverman JD, Kruger L. Selective neuronal glycoconjugate expression in sensory and autonomic ganglia: relation of lectin reactivity to peptide and enzyme markers. *J Neurocytol.* 1990;19(5):789-801.
45. Wang H, Rivero-Melian C, Robertson B, Grant G. Transganglionic transport and binding of the isolectin B4 from *Griffonia simplicifolia* I in rat primary sensory neurons. *Neuroscience.* 1994;62(2):539-51.
46. Fang X, Djouhri L, McMullan S, Berry C, Waxman SG, Okuse K, Lawson SN. Intense isolectin-B4 binding in rat dorsal root ganglion neurons distinguishes C-fiber nociceptors with broad action potentials and high Nav1.9 expression. *J Neurosci.* 2006;26(27):7281-92.
47. Malcangio M, Malcangio M, SpringerLink. *Synaptic Plasticity in Pain.* 1st 2009. ed. New York, NY: Springer New York : Imprint: Springer; 2009.
48. Hille B. *Ion channels of excitable membranes.* Third edition. ed. Sunderland, Massachusetts, U.S.A: Sinauer Associates, Inc., Publishers; 2001. xviii, 814 pages, 8 unnumbered pages of plates : illustrations (some colour) p.
49. Rush AM, Cummins TR, Waxman SG. Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. *J Physiol.* 2007;579(Pt 1):1-14.
50. Devor M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain.* 2006;7(1 Suppl 1):S3-S12.
51. Ishikawa K, Tanaka M, Black JA, Waxman SG. Changes in expression of voltage-gated potassium channels in dorsal root ganglion neurons following axotomy. *Muscle Nerve.* 1999;22(4):502-7.

52. Tsantoulas C, McMahon SB. Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci.* 2014;37(3):146-58.
53. McCallum JB, Kwok WM, Sapunar D, Fuchs A, Hogan QH. Painful peripheral nerve injury decreases calcium current in axotomized sensory neurons. *Anesthesiology.* 2006;105(1):160-8.
54. Lirk P, Poroli M, Rigaud M, Fuchs A, Phillip P, Huang CY, et al. Modulators of calcium influx regulate membrane excitability in rat dorsal root ganglion neurons. *Anesth Analg.* 2008;107(2):673-85.
55. Hogan QH. Role of decreased sensory neuron membrane calcium currents in the genesis of neuropathic pain. *Croat Med J.* 2007;48(1):9-21.
56. Djouhri L, Lawson SN. Differences in the size of the somatic action potential overshoot between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the guinea-pig. *Neuroscience.* 2001;108(3):479-91.
57. Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials.* 1997;18(24):1573-83.
58. Vogel V, Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(4):265-75.
59. Thomas CH, Collier JH, Sfeir CS, Healy KE. Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(4):1972-7.
60. Vergani L, Grattarola M, Nicolini C. Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(8):1447-61.
61. Simitzi C, Ranella A, Stratakis E. Controlling the morphology and outgrowth of nerve and neuroglial cells: The effect of surface topography. *Acta biomaterialia.* 2017;51:21-52.
62. Bukoreshtliev NV, Haase K, Pelling AE. Mechanical cues in cellular signalling and communication. *Cell Tissue Res.* 2013;352(1):77-94.

63. Kim DH, Provenzano PP, Smith CL, Levchenko A. Matrix nanotopography as a regulator of cell function. *J Cell Biol.* 2012;197(3):351-60.
64. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(1):21-33.
65. Goodman SL, Sims PA, Albrecht RM. Three-dimensional extracellular matrix textured biomaterials. *Biomaterials.* 1996;17(21):2087-95.
66. Dent EW, Gertler FB. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 2003;40(2):209-27.
67. Dickinson RB, Guido S, Tranquillo RT. Biased cell migration of fibroblasts exhibiting contact guidance in oriented collagen gels. *Ann Biomed Eng.* 1994;22(4):342-56.
68. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Trier SM, Keely PJ. Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys J.* 2008;95(11):5374-84.
69. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science.* 2005;310(5751):1139-43.
70. DuFort CC, Paszek MJ, Weaver VM. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(5):308-19.
71. McMurray RJ, Dalby MJ, Tsimbouri PM. Using biomaterials to study stem cell mechanotransduction, growth and differentiation. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* 2015;9(5):528-39.
72. Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol.* 1972;145(1):61-83.
73. Hynes RO, Patel R, Miller RH. Migration of neuroblasts along preexisting axonal tracts during prenatal cerebellar development. *J Neurosci.* 1986;6(3):867-76.
74. Ono K, Kawamura K. Migration of immature neurons along tangentially oriented fibers in the subpial part of the fetal mouse medulla oblongata. *Exp Brain Res.* 1989;78(2):290-300.

75. Lowery LA, Van Vactor D. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(5):332-43.
76. Chen YY, McDonald D, Cheng C, Magnowski B, Durand J, Zochodne DW. Axon and Schwann cell partnership during nerve regrowth. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(7):613-22.
77. Nikkhah M, Edalat F, Manoucheri S, Khademhosseini A. Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface. *Biomaterials.* 2012;33(21):5230-46.
78. Bettinger CH, Langer R, Borenstein J. Engineering substrate topography at the micro- and nanoscale to control cell function. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;48(30):5406-15.
79. Hoffman-Kim D, Mitchel JA, Bellamkonda RV. Topography, cell response, and nerve regeneration. *Annual review of biomedical engineering.* 2010;12:203-31.
80. Nguyen AT, Sathe SR, Yim EK. From nano to micro: topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance. *Journal of physics Condensed matter : an Institute of Physics journal.* 2016;28(18):183001.
81. Lim JY, Donahue HJ. Cell sensing and response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning. *Tissue engineering.* 2007;13(8):1879-91.
82. Guillemette MD, Cui B, Roy E, Gauvin R, Giasson CJ, Esch MB, et al. Surface topography induces 3D self-orientation of cells and extracellular matrix resulting in improved tissue function. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro.* 2009;1(2):196-204.
83. Cutiongco MF, Kukumberg M, Peneyra JL, Yeo MS, Yao JY, Rufaihah AJ, et al. Submillimeter Diameter Poly(Vinyl Alcohol) Vascular Graft Patency in Rabbit Model. *Front Bioeng Biotechnol.* 2016;4:44.
84. Baranes K, Chejanovsky N, Alon N, Sharoni A, Shefi O. Topographic cues of nano-scale height direct neuronal growth pattern. *Biotechnol Bioeng.* 2012;109(7):1791-7.

85. Clark P, Connolly P, Curtis AS, Dow JA, Wilkinson CD. Cell guidance by ultrafine topography in vitro. *J Cell Sci.* 1991;99 (Pt 1):73-7.
86. Corey JM, Lin DY, Mycek KB, Chen Q, Samuel S, Feldman EL, Martin DC. Aligned electrospun nanofibers specify the direction of dorsal root ganglia neurite growth. *Journal of biomedical materials research Part A.* 2007;83(3):636-45.
87. Huang YA, Ho CT, Lin YH, Lee CJ, Ho SM, Li MC, Hwang E. Nanoimprinted Anisotropic Topography Preferentially Guides Axons and Enhances Nerve Regeneration. *Macromol Biosci.* 2018;18(12):e1800335.
88. Johansson F, Carlberg P, Danielsen N, Montelius L, Kanje M. Axonal outgrowth on nano-imprinted patterns. *Biomaterials.* 2006;27(8):1251-8.
89. Schnell E, Klinkhammer K, Balzer S, Brook G, Klee D, Dalton P, Mey J. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend. *Biomaterials.* 2007;28(19):3012-25.
90. Tonazzini I, Pellegrini M, Pellegrino M, Cecchini M. Interaction of leech neurons with topographical gratings: comparison with rodent and human neuronal lines and primary cells. *Interface Focus.* 2014;4(1):20130047.
91. Wang HB, Mullins ME, Cregg JM, McCarthy CW, Gilbert RJ. Varying the diameter of aligned electrospun fibers alters neurite outgrowth and Schwann cell migration. *Acta biomaterialia.* 2010;6(8):2970-8.
92. Goldner JS, Bruder JM, Li G, Gazzola D, Hoffman-Kim D. Neurite bridging across micropatterned grooves. *Biomaterials.* 2006;27(3):460-72.
93. Nagata I, Kawana A, Nakatsuji N. Perpendicular contact guidance of CNS neuroblasts on artificial microstructures. *Development.* 1993;117(1):401-8.
94. Rajnicek A, Britland S, McCaig C. Contact guidance of CNS neurites on grooved quartz: influence of groove dimensions, neuronal age and cell type. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 23):2905-13.

95. Dowell-Mesfin NM, Abdul-Karim MA, Turner AM, Schanz S, Craighead HG, Roysam B, et al. Topographically modified surfaces affect orientation and growth of hippocampal neurons. *Journal of neural engineering*. 2004;1(2):78-90.
96. Mattotti M, Micholt L, Braeken D, Kovacic D. Characterization of spiral ganglion neurons cultured on silicon micro-pillar substrates for new auditory neuro-electronic interfaces. *Journal of neural engineering*. 2015;12(2):1741-2560.
97. Micholt L, Gartner A, Prodanov D, Braeken D, Dotti CG, Bartic C. Substrate topography determines neuronal polarization and growth in vitro. *PloS one*. 2013;8(6).
98. Park M, Oh E, Seo J, Kim MH, Cho H, Choi JY, et al. Control over Neurite Directionality and Neurite Elongation on Anisotropic Micropillar Arrays. *Small*. 2016;12(9):1148-52.
99. Radotic V, Bedalov A, Drvis P, Braeken D, Kovacic D. Guided growth with aligned neurites in adult spiral ganglion neurons cultured in vitro on silicon micro-pillar substrates. *Journal of neural engineering*. 2019;16(6):066037.
100. Xie C, Hanson L, Xie W, Lin Z, Cui B, Cui Y. Noninvasive neuron pinning with nanopillar arrays. *Nano Lett*. 2010;10(10):4020-4.
101. Hanson JN, Motala MJ, Heien ML, Gillette M, Sweedler J, Nuzzo RG. Textural guidance cues for controlling process outgrowth of mammalian neurons. *Lab on a chip*. 2009;9(1):122-31.
102. Simitzi C, Stratakis E, Fotakis C, Athanassakis I, Ranella A. Microconical silicon structures influence NGF-induced PC12 cell morphology. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2015;9(4):424-34.
103. Hallstrom W, Martensson T, Prinz C, Gustavsson P, Montelius L, Samuelson L, Kanje M. Gallium phosphide nanowires as a substrate for cultured neurons. *Nano Lett*. 2007;7(10):2960-5.
104. Prinz C, Hallstrom W, Martensson T, Samuelson L, Montelius L, Kanje M. Axonal guidance on patterned free-standing nanowire surfaces. *Nanotechnology*. 2008;19(34):345101.

105. Gomez N, Lu Y, Chen S, Schmidt CE. Immobilized nerve growth factor and microtopography have distinct effects on polarization versus axon elongation in hippocampal cells in culture. *Biomaterials*. 2007;28(2):271-84.
106. Haq F, Anandan V, Keith C, Zhang G. Neurite development in PC12 cells cultured on nanopillars and nanopores with sizes comparable with filopodia. *International journal of nanomedicine*. 2007;2(1):107-15.
107. Koh HS, Yong T, Chan CK, Ramakrishna S. Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin. *Biomaterials*. 2008;29(26):3574-82.
108. Mahoney MJ, Chen RR, Tan J, Saltzman WM. The influence of microchannels on neurite growth and architecture. *Biomaterials*. 2005;26(7):771-8.
109. Foley JD, Grunwald EW, Nealey PF, Murphy CJ. Cooperative modulation of neuritogenesis by PC12 cells by topography and nerve growth factor. *Biomaterials*. 2005;26(17):3639-44.
110. Bourke JL, Coleman HA, Pham V, Forsythe JS, Parkington HC. Neuronal electrophysiological function and control of neurite outgrowth on electrospun polymer nanofibers are cell type dependent. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(5-6):1089-95.
111. Jang MJ, Kim WR, Joo S, Ryu JR, Lee E, Nam Y, Sun W. Cell-Type Dependent Effect of Surface-Patterned Microdot Arrays on Neuronal Growth. *Front Neurosci*. 2016;10:217.
112. von Philipsborn AC, Lang S, Loeschinger J, Bernard A, David C, Lehnert D, et al. Growth cone navigation in substrate-bound ephrin gradients. *Development*. 2006;133(13):2487-95.
113. Kundu A, Micholt L, Friedrich S, Rand DR, Bartic C, Braeken D, Levchenko A. Superimposed topographic and chemical cues synergistically guide neurite outgrowth. *Lab on a chip*. 2013;13(15):3070-81.
114. Bucaro MA, Vasquez Y, Hatton BD, Aizenberg J. Fine-tuning the degree of stem cell polarization and alignment on ordered arrays of high-aspect-ratio nanopillars. *ACS Nano*. 2012;6(7):6222-30.

115. Hodgkin ALH, A. F. Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature*. 1939;144(3651):710-1.
116. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*. 1976;260(5554):799-802.
117. Freygang WH, Jr. An analysis of extracellular potentials from single neurons in the lateral geniculate nucleus of the cat. *J Gen Physiol*. 1958;41(3):543-64.
118. Pine J. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *J Neurosci Methods*. 1980;2(1):19-31.
119. Fröhlich F, ScienceDirect. *Network neuroscience*. London: Academic Press; 2016.
120. Brette R, Brette R, Destexhe A, Cambridge University P. *Handbook of neural activity measurement*. Cambridge: Cambridge University Press; 2012.
121. Li WC, Soffe SR, Roberts A. A direct comparison of whole cell patch and sharp electrodes by simultaneous recording from single spinal neurons in frog tadpoles. *J Neurophysiol*. 2004;92(1):380-6.
122. Staley KJ, Otis TS, Mody I. Membrane properties of dentate gyrus granule cells: comparison of sharp microelectrode and whole-cell recordings. *J Neurophysiol*. 1992;67(5):1346-58.
123. Purves RD. *Microelectrode methods for intracellular recording and ionophoresis*. London ; New York: Academic Press; 1981. x, 146 pages : illustrations p.
124. Neher E, Sakmann B. The patch clamp technique. *Sci Am*. 1992;266(3):44-51.
125. Huys R, Braeken D, Jans D, Stassen A, Collaert N, Wouters J, et al. Single-cell recording and stimulation with a 16k micro-nail electrode array integrated on a 0.18 μm CMOS chip. *Lab on a chip*. 2012;12(7):1274-80.
126. Heer F, Hafizovic S, Ugniwenko T, Frey U, Franks W, Perriard E, et al. Single-chip microelectronic system to interface with living cells. *Biosens Bioelectron*. 2007;22(11):2546-53.

127. Israel Z, Burchiel KJMDJRP, Chairman. Microelectrode Recording in Movement Disorder Surgery. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2004.
128. Obien ME, Deligkaris K, Bullmann T, Bakkum DJ, Frey U. Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Front Neurosci.* 2014;8:423.
129. Egert U, Heck D, Aertsen A. Two-dimensional monitoring of spiking networks in acute brain slices. *Exp Brain Res.* 2002;142(2):268-74.
130. Henze DA, Borhegyi Z, Csicsvari J, Mamiya A, Harris KD, Buzsaki G. Intracellular features predicted by extracellular recordings in the hippocampus in vivo. *J Neurophysiol.* 2000;84(1):390-400.
131. Cavanaugh JR, Bair W, Movshon JA. Nature and interaction of signals from the receptive field center and surround in macaque V1 neurons. *J Neurophysiol.* 2002;88(5):2530-46.
132. Snider RK, Kabara JF, Roig BR, Bonds AB. Burst firing and modulation of functional connectivity in cat striate cortex. *J Neurophysiol.* 1998;80(2):730-44.
133. Kelly RC, Smith MA, Samonds JM, Kohn A, Bonds AB, Movshon JA, Lee TS. Comparison of recordings from microelectrode arrays and single electrodes in the visual cortex. *J Neurosci.* 2007;27(2):261-4.
134. Spira ME, Hai A. Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. *Nat Nanotechnol.* 2013;8(2):83-94.
135. Jones IL, Livi P, Lewandowska MK, Fiscella M, Roscic B, Hierlemann A. The potential of microelectrode arrays and microelectronics for biomedical research and diagnostics. *Anal Bioanal Chem.* 2011;399(7):2313-29.
136. Ballini M, Muller J, Livi P, Chen Y, Frey U, Stettler A, et al. A 1024-Channel CMOS Microelectrode Array With 26,400 Electrodes for Recording and Stimulation of Electrogenic Cells In Vitro. *IEEE J Solid-State Circuits.* 2014;49(11):2705-19.

137. Bakkum DJ, Frey U, Radivojevic M, Russell TL, Muller J, Fiscella M, et al. Tracking axonal action potential propagation on a high-density microelectrode array across hundreds of sites. *Nat Commun.* 2013;4(2181).
138. Muller J, Ballini M, Livi P, Chen Y, Radivojevic M, Shadmani A, et al. High-resolution CMOS MEA platform to study neurons at subcellular, cellular, and network levels. *Lab on a chip.* 2015;15(13):2767-80.
139. Radivojevic M, Franke F, Altermatt M, Muller J, Hierlemann A, Bakkum DJ. Tracking individual action potentials throughout mammalian axonal arbors. *Elife.* 2017;6.
140. Stett A, Egert U, Guenther E, Hofmann F, Meyer T, Nisch W, Haemmerle H. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Anal Bioanal Chem.* 2003;377(3):486-95.
141. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 1992;116(1):201-11.
142. Ayres CE, Jha BS, Meredith H, Bowman JR, Bowlin GL, Henderson SC, Simpson DG. Measuring fiber alignment in electrospun scaffolds: a user's guide to the 2D fast Fourier transform approach. *Journal of biomaterials science Polymer edition.* 2008;19(5):603-21.
143. Taylor SA, Cao T, Talauliker PM, Lifshitz J. Objective morphological quantification of microscopic images using a fast Fourier transform (FFT) analysis. In: Gallagher SR, A. WE, editors. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques.* 2. ed: Wiley, 2012; 2012.
144. Emilie L, Tihana M, Antonio S, Damir K, Dries B, Damir S. Directionality quantification of in vitro grown dorsal root ganglion neurites using Fast Fourier Transform. *J Neurosci Methods.* 2023;386:109796.
145. Ayres C, Bowlin GL, Henderson SC, Taylor L, Shultz J, Alexander J, et al. Modulation of anisotropy in electrospun tissue-engineering scaffolds: Analysis of fiber alignment by the fast Fourier transform. *Biomaterials.* 2006;27(32):5524-34.
146. Harper AA, Lawson SN. Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities. *J Physiol.* 1985;359:47-63.

147. Miller C, Jeftinija S, Mallapragada S. Synergistic effects of physical and chemical guidance cues on neurite alignment and outgrowth on biodegradable polymer substrates. *Tissue engineering*. 2002;8(3):367-78.
148. Prinz CN. Interactions between semiconductor nanowires and living cells. *Journal of physics Condensed matter : an Institute of Physics journal*. 2015;27(23):233103.
149. Walsh JF, Manwaring ME, Tresco PA. Directional neurite outgrowth is enhanced by engineered meningeal cell-coated substrates. *Tissue engineering*. 2005;11(7-8):1085-94.
150. Spedden E, Wiens MR, Demirel MC, Staii C. Effects of surface asymmetry on neuronal growth. *PloS one*. 2014;9(9):e106709.
151. Condic ML. Adult neuronal regeneration induced by transgenic integrin expression. *J Neurosci*. 2001;21(13):4782-8.
152. Houchin-Ray T, Swift LA, Jang JH, Shea LD. Patterned PLG substrates for localized DNA delivery and directed neurite extension. *Biomaterials*. 2007;28(16):2603-11.
153. Li J, McNally H, Shi R. Enhanced neurite alignment on micro-patterned poly-L-lactic acid films. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2008;87(2):392-404.
154. Lietz M, Dreesmann L, Hoss M, Oberhoffner S, Schlosshauer B. Neuro tissue engineering of glial nerve guides and the impact of different cell types. *Biomaterials*. 2006;27(8):1425-36.
155. Poole K, Herget R, Lapatsina L, Ngo HD, Lewin GR. Tuning Piezo ion channels to detect molecular-scale movements relevant for fine touch. *Nat Commun*. 2014;5:3520.
156. Repic T, Madirazza K, Bektur E, Sapunar D. Characterization of dorsal root ganglion neurons cultured on silicon micro-pillar substrates. *Scientific reports*. 2016;6:39560.
157. Abbott J, Ye T, Krenek K, Gertner RS, Ban S, Kim Y, et al. A nanoelectrode array for obtaining intracellular recordings from thousands of connected neurons. *Nat Biomed Eng*. 2020;4(2):232-41.

158. Yuan X, Hierlemann A, Frey U. Extracellular Recording of Entire Neural Networks Using a Dual-Mode Microelectrode Array With 19584 Electrodes and High SNR. *IEEE J Solid-State Circuits*. 2021;56(8):2466-75.
159. Peterka DS, Takahashi H, Yuste R. Imaging voltage in neurons. *Neuron*. 2011;69(1):9-21.
160. Wang Y, Liu S, Wang H, Zhao Y, Zhang XD. Neuron devices: emerging prospects in neural interfaces and recognition. *Microsyst Nanoeng*. 2022;8:128.
161. Flesher SN, Downey JE, Weiss JM, Hughes CL, Herrera AJ, Tyler-Kabara EC, et al. A brain-computer interface that evokes tactile sensations improves robotic arm control. *Science*. 2021;372(6544):831-6.
162. Korner J, Lampert A. Functional subgroups of rat and human sensory neurons: a systematic review of electrophysiological properties. *Pflugers Arch*. 2022;474(4):367-85.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: **Tihana Marciuš**
Adresa: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju
Šoltanska 2, 21000 Split, Hrvatska
Kontakt: marcius.tihana@gmail.com
Datum i mjesto rođenja: 6. ožujka 1990., Varaždin, Hrvatska
Djevojačko prezime: Repić
Obiteljski status: Udana, troje djece

Obrazovanje:

2015 – danas **Doktorski studij iz područja Biomedicine i zdravstva**
Poslijediplomski studij TRIBE – Translacijska istraživanja u
biomedicini, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Hrvatska
Doktorska disertacija: Karakterizacija neurona spinalnih ganglija
uzgojenih na mikro-igličastim podlogama

2011 – 2014 **Magistar molekularne biologije (mag. mol. biol.)**
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska
Diplomski rad: Usporedba osteogenog potencijala humanih
mezenhimskih matičnih stanica izoliranih iz mišićnog i tetivnog tkiva

2008 – 2011 **Prvostupnik molekularne biologije (univ. bacc. mol. biol.)**
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska
Završni rad: Bakterije koje koriste arsen

2004 – 2008 **Opća gimnazija**
Prva gimnazija Varaždin, Hrvatska

Radno iskustvo:

2015 – danas **Doktorand na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Hrvatska
HRZZ projekt: Liječenje neuropatske boli stimulacijom spinalnog
ganglija (NeuroMod), voditelj: prof. Damir Sapunar, dr. med.

Tehničke vještine i kompetencije:

- Rad u sterilnim uvjetima sa staničnim kulturama (izrada protokola, enzimski i mehanička razgradnja tkiva, priprema medija i podloga, održavanje kulture animalnih stanica)
- Rad s kemikalijama (nabava i priprema reagensa, otopina, staničnih medija)
- Rukovanje laboratorijskim životinjama, kirurški zahvati (izolacija spinalnih ganglija, podvezivanje spinalnog živca, implantacija elektroda), testovi ponašanja životinja
- Imunocitokemija i imunohistokemija
- Svjetlosna, fluorescentna i elektronska mikroskopija (SEM)
- Morfološka analiza neurona
- Elektrofiziološka analiza neurona - Whole-cell patch-clamp (priprema otopina, podešavanje uređaja, kalibriranje, izrada patch-pipeta, metode mikromanipulacije, izrada protokola, elektrofiziološko snimanje i analiza)
- Pisanje znanstvenih radova, izrada sustavnih pregleda
- Statistika (GraphPad)

2013 – 2014

Stručna praksa na Zavodu za molekularnu biologiju

Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska

Tehničke vještine i kompetencije:

- Rad u sterilnim uvjetima sa staničnim kulturama (priprema medija i održavanje kultura humanih mezenhimskih matičnih stanica izoliranih iz mišićnog i tetivnog tkiva – postupak izolacije, proliferacije i osteogene diferencijacije hMSC)
- Molekularne tehnike analize proteina i nukleinskih kiselina (DNA, RNA) – Izolacija i kvantifikacija, Real-time PCR, SDS-PAGE, Western blot
- Citokemijska bojanja
- Krioprezervacija

Usavršavanja i sudjelovanja na kongresima:

- | | |
|------|--|
| 2017 | COST EMF-MED radionica i sastanak radne skupine – usmena prezentacija Beč, Austrija |
| 2017 | 6. Hrvatski kongres neuroznanosti – usmena i poster prezentacija Osijek, Hrvatska |

- 2017 21st Young Neuroscientist Meeting – usmena prezentacija
Zagreb, Hrvatska
- 2017 CroLASA radionica „Kako prijaviti pokus na životinjama“
Zagreb, Hrvatska
- 2016 16th World Congress on Pain, IASP – poster prezentacija
Yokohama, Japan
- 2016 Europska škola boli – Međunarodna organizacija za istraživanje boli –
usmena prezentacija
Siena, Italija
- 2015 Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama
(Kategorija 3)
Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Hrvatska
- 2013 8th ISABS Conference in Forensic, Anthropologic and Medical
Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine
Split, Hrvatska
- 2009 – 2013 Studentski poslovi – Promotor za marketinške agencije

Publikacije:

1. **Marcuš T**, Deftu A-F, Vuka I, Braeken D, Sapunar D. Electrophysiological properties of dorsal root ganglion neurons cultured on 3D silicon micro-pillar substrates. 2024. (Prihvaćen za objavu 27. veljače 2024).
2. Emilie L, **Tihana M**, Antonio Š, Damir K, Dries B, Damir S. Directionality quantification of in vitro grown dorsal root ganglion neurites using Fast Fourier Transform. J Neurosci Methods. 2023 Feb 15; 386:109796. doi: 10.1016/j.jneumeth.2023.109796. Epub 2023 Jan 15. PMID: 36652975.
3. Vuka I, **Marcuš T**, Kovačić D, Šarolić A, Puljak L, Sapunar D. Implantable, Programmable, and Wireless Device for Electrical Stimulation of the Dorsal Root Ganglion in Freely-Moving Rats: A Proof-of-Concept Study. J Pain Res. 2021 Dec 9; 14:3759-3772. doi: 10.2147/JPR.S332438. PMID: 34916842; PMCID: PMC8668248.
4. Vuka I, **Marcuš T**, Došenović S, Ferhatović Hamzić L, Vučić K, Sapunar D, Puljak L. Efficacy and Safety of Pulsed Radiofrequency as a Method of Dorsal Root Ganglia

Stimulation in Patients with Neuropathic Pain: A Systematic Review. *Pain Med.* 2020 Dec 25;21(12):3320-3343. doi: 10.1093/pm/pnaa141. PMID: 32488240.

5. Vuka I, Došenović S, **Marciuš T**, Ferhatović Hamzić L, Vučić K, Sapunar D, Puljak L. Efficacy and safety of pulsed radiofrequency as a method of dorsal root ganglia stimulation for treatment of non-neuropathic pain: a systematic review. *BMC Anesthesiol.* 2020 May 4;20(1):105. doi: 10.1186/s12871-020-01023-9. PMID: 32366286; PMCID: PMC7199300.
6. Vuka I, **Marciuš T**, Došenović S, Ferhatović Hamzić L, Vučić K, Sapunar D, Puljak L. Neuromodulation with electrical field stimulation of dorsal root ganglion in various pain syndromes: a systematic review with focus on participant selection. *J Pain Res.* 2019 Feb 27; 12:803-830. doi: 10.2147/JPR.S168814. PMID: 30881093; PMCID: PMC6398970.
7. Vuka I, Vučić K, **Repić T**, Ferhatović Hamzić L, Sapunar D, Puljak L. Electrical Stimulation of Dorsal Root Ganglion in the Context of Pain: A Systematic Review of In Vitro and In Vivo Animal Model Studies. *Neuromodulation.* 2018 Apr;21(3):213-224. doi: 10.1111/ner.12722. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29152818.
8. **Repić T**, Madirazza K, Bektur E, Sapunar D. Characterization of dorsal root ganglion neurons cultured on silicon micro-pillar substrates. *Sci Rep.* 2016 Dec 23; 6:39560. doi: 10.1038/srep39560. PMID: 28008963; PMCID: PMC5180168.

Strani jezici:

Hrvatski (Materinji), **Engleski** (Napredan), **Njemački** (Bazičan)

Ostale aktivnosti:

Predstavnik studenata doktorskog studija TRIBE (generacija 2014/15)

Član udruženja International Association for the Study of Pain (IASP)

Volonter u provedbi predavanja Festivala znanosti u Splitu (2015)